

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

11/26/86
Tej
13

LIBERACION IN VIVO DE PROTEINAS
EN AREAS ESPECIFICAS DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL: DESARROLLO
METODOLOGICO Y ESTUDIOS NEUROQUI-
MICOS.

TRABAJO DE TESIS QUE PRESENTA LA:
MÉDICA CIRUJANA SARA IRENIA SOLA-
NO SÁNCHEZ.

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (ORIENTA -
CIÓN BIOLÓGICA MOLECULAR).

FALLA DE ORIGEN

CIUDAD UNIVERSITARIA

México, D.F. 1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

INDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN

I	INTRODUCCIÓN	I
II	ANTECEDENTES	
	A) PERFUSIÓN INTRACEREBRAL CON CÁNULAS DE INFUSIÓN EXTRACCIÓN.	3
	B) MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESIÓN O DE VIABILIDAD TISULAR.	7
	1) PROTEÍNAS	8
	2) ACETILCOLINESTERASA	10
	3) PROTEASAS	13
	4) DESHIDROGENASA LÁCTICA	14
	5) GABA Y ENCEFALINAS	14
III	DESARROLLO EXPERIMENTAL	
	A) CONSIDERACIONES SOBRE ALGUNOS OBSERVABLES FÍSICOS COMO MARCADORES DE LESIÓN TISULAR DURANTE LA PERFUSIÓN, MODIFICACIONES AL SISTEMA DE PERFUSIÓN CEREBRAL <u>IN VIVO</u> .	16
	1) OBSTRUCCIÓN DEL FLUJO	17
	2) DESBALANCE AÚN TEMPORAL, EN EL INFLUJO-EFLUJO DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.	21
	3) SANGRADO DURANTE LA PERFUSIÓN	24

B) TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE PROTEÍNAS Y ENZIMAS EN PERFUSADOS DE CEREBRO: DESARROLLO METODOLÓGICO.	
1) DESHIDROGENASA LÁCTICA	26
2) ACETILCOLINESTERASA	33
3) PROTEÍNAS	38
4) PROTEASAS	39
C) EVALUACIÓN DE ALGUNOS MARCADORES FÍSICOS DE LESIÓN TISULAR DURANTE UNA PERFUSIÓN <u>IN VIVO</u> Y SU RELACIÓN CON LA LIBERACIÓN DE GABA EXÓGENO.	43
1) OBSTRUCCIÓN DEL FLUJO VOLUMEN DE RECUPERACIÓN.	47
2) SANGRADO Y OBSTRUCCIÓN	53
D) VALIDACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS COMO MARCADORES DE LESIÓN TISULAR Y COMO MARCADORES DE VIABILIDAD CELULAR EN UNA PERFUSIÓN.	55
1) LIBERACIÓN POR ESTIMULACIÓN.	
A) ³ H-GABA	56
B) PROTEÍNAS	59
C) ACETILCOLINESTERASA	59
2) LIBERACIÓN POR LESIÓN	
A) DESHIDROGENASA LÁCTICA	64
B) PROTEASAS	67

E) COMPARACIÓN ENTRE LA CÁNULA TRADICIONAL Y LA CÁNULA RANURADA. PARÁMETROS FÍSICOS Y PARÁMETROS QUÍMICOS.

70

IV DISCUSIÓN

75

V CONCLUSIONES

87

VI APÉNDICE

89

VII BIBLIOGRAFÍA

105

INDICE DE FIGURAS

- FIG. 1.- CÁNULA TRADICIONAL
- FIG. 2.- CÁNULA RANURADA
- FIG. 3.- BOMBA DE JERINGAS, RECIPROCANTE (HARVARD)
- FIG. 4.- BOMBA POLISTÁLTICA
- FIG. 5.- ESQUEMATIZACIÓN DE LOS SITIOS EN QUE SE LLEVAN A CABO LAS ESTIMULACIONES QUÍMICAS Y LA MECÁNICA, DURANTE EL CURSO DE UNA PERFUSIÓN.
- FIG. 6.- PERFIL DE VOLÚMENES. BOMBA HARVARD.
- FIG. 7.- PERFIL DE VOLÚMENES. BOMBA POLISTÁLTICA.
- FIG. 8.- PERFIL DE VOLÚMENES. PROBLEMAS HIDRODINÁMICOS. BOMBA HARVARD.
- FIG. 9.- PERFIL DE VOLÚMENES. OBSTRUCCIÓN TOTAL. BOMBA POLISTÁLTICA.
- FIG. 10.- FRECUENCIA DE LA PRESENCIA DE ACCIDENTES: SANGRADOS Y OBSTRUCCIONES, EN 2 GRUPOS DE PERFUSIONES.
- FIG. 11.- DETERMINACIÓN DE DESHIDROGENASA LÁCTICA. CINÉTICA DE 10 MIN.
- FIG. 12.- OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA DEL NADH. DETERMINACIÓN DE DHL. CINÉTICA DE 24 HRS.
- FIG. 13.- CURVA PATRÓN DE LA ACTIVIDAD DE DHL.
- FIG. 14.- DETERMINACIÓN DE ACETILCOLINESTERASA. CINÉTICA DE 10 MIN.
- FIG. 15.- DEGRADACIÓN NO ENZIMÁTICA DE LA ACETILTIOCOLINA. DETERMINACIÓN DE ACETILCOLINESTERASA. CINÉTICA DE 24 HRS.
- FIG. 16.- CURVA PATRÓN DE LA ACTIVIDAD DE ACETILCOLINESTERASA.
- FIG. 17.- CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TRIPSINA.
- FIG. 18.- CURVA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD DE PROTEASAS.
- FIG. 19.- PERFIL DE LIBERACIÓN DE GABA H³ EN UNA PERFUSIÓN SIN ACCIDENTES.

- FIG. 20.- PERFIL DE LIBERACIÓN DE GABA H³. PROMEDIO DE 8 PERFUSIONES.
- FIG. 21.- PERFIL DE PROTEÍNAS EN UNA PERFUSIÓN CON ACCIDENTES.
- FIG. 22.- PERFIL DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS. PROMEDIO DE 8 PERFUSIONES EN GLOBO PÁLIDO.
- FIG. 23.- PERFIL DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS. PROMEDIO DE 4 PERFUSIONES EN NÚCLEO CAUDADO.
- FIG. 24.- PERFIL DE LIBERACIÓN DE ACETILCOLINESTERASA. PROMEDIO DE 4 PERFUSIONES EN NÚCLEO CAUDADO.
- FIG. 25.- PERFIL DE LA ACTIVIDAD DE DESHIDROGENASA LÁCTICA. PROMEDIO DE 8 PERFUSIONES EN GLOBO PÁLIDO.
- FIG. 26.- PERFIL DE LA ACTIVIDAD DE DESHIDROGENASA LÁCTICA EN UNA PERFUSIÓN.
- FIG. 27.- PERFIL DE LIBERACIÓN DE PROTEASAS. PROMEDIO DE 4 PERFUSIONES EN NÚCLEO CAUDADO.

INDICE DE TABLAS

- TABLA 1.- CONJUNTO DE PERFUSIONES 100% EXITOSAS**
- TABLA 2.- CONJUNTO DE PERFUSIONES CON UN ÉXITO DEL 50 AL 66% .**
- TABLA 3.- CONJUNTO DE PERFUSIONES NO EXITOSAS.**
- TABLA 4.- LIBERACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y PROTEÍNA TOTAL EN LA REGIÓN DEL ESTRIADO DE RATA; PRODUCCIÓN POR DEPOLARIZACIÓN QUÍMICA Ó POR DAÑO MECÁNICO.**
- TABLA 5.- FRECUENCIA DE ACCIDENTES DURANTE UNA PERFUSIÓN. COMPARACIÓN ENTRE LA CÁNULA TRADICIONAL Y LA CÁNULA RANURADA. COMPARACIÓN ENTRE LA BOMBA RECIPROCANTE Y LA BOMBA POLISTÁLTICA. PARÁMETROS FÍSICOS.**
- TABLA 6.- FRECUENCIA DE ACCIDENTES DURANTE UNA PERFUSIÓN. COMPARACIÓN ENTRE LA CÁNULA TRADICIONAL Y LA CÁNULA RANURADA. PARÁMETROS FÍSICOS.**
- TABLA 7.- COMPARACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LA CÁNULA TRADICIONAL Y LA CÁNULA RANURADA. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.**

ABREVIATURAS

- ACH.- ACETILCOLINA
ACHE.- ACETILCOLINESTERASA
ATIOCH.- ACETILTIOCOLINA
A-P.- ANTERO-POSTERIOR
BSA.- ALBÚMINA DE SUERO BOVINO
DBH.- DOPAMINA β -HIDROXILASA
DER.- DERECHO
DHL.- DESHIDROGENASA LÁCTICA
DTNB.- DITIOBISNITROBENZOATO
GABA.- ACIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO
GABA H³.- ACIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO TRITIADO
GP.- GLOBO PÁLIDO
HPA.- HIDE POWDER AZURE
IZQ.- IZQUIERDO
LCR.- LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO
NADH.- NICOTÍN ADENÍN DINUCLEÓTIDO
NC.- NÚCLEO CAUDADO
NE.- NOR-EPINEFRINA
S.N.C.- SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
S.N.- SISTEMA NERVIOSO

AGRADECIMIENTOS

MI AGRADECIMIENTO A LAS SIGUIENTES PERSONAS POR EL APOYO QUE ME BRINDARON.

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA

DPTO. DE BIOQUÍMICA. FAC. DE MEDICINA UNAM.

DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

BIOLOGA LOURDES LUGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FISIOLÓGIA CELULAR UNAM.

DR. RENÉ DRUCKER-COLÍN

DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM.

FOTÓGRAFO RAÚL BERNAL M.

DIBUJANTE RAÚL CARDOSO G.

INSTITUTO MEXICANO DE PSICUIATRÍA. SSA.

DE IGUAL MANERA AGRADEZCO LAS VALIOSAS SUGERENCIAS APORTADAS A MI TRABAJO DE TESIS POR:

DR. JUAN C. DÍAZ ZAGOYA

DR. RENÉ DRUCKER-COLÍN

DRA. CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE

DR. LOURIVAL POSSANI

DR. ANTONIO ROJAS RAMÍREZ

DR. CARLOS M. VALVERDE RODRÍGUEZ

PARTICULARMENTE AGRADEZCO AL DR. ALEJANDRO BAYÓN CASO, QUIÉN FUNGIÓ COMO MI ASESOR DE TESIS.

EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ EN LOS SIGUIENTES LUGARES: CENTRO DE INVESTIGACIONES EN FISIOLÓGIA CELULAR (CIFICE, AHORA INSTITUTO), INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (IIBM) AMBOS, DEPENDENCIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS DEL INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRÍA (IMP).

A LAS DEPENDENCIAS ANTES MENCIONADAS HAGO PATENTE MI RECONOCIMIENTO.

RESUMEN

HACE 20 AÑOS SE PENSABA QUE LA COMUNICACIÓN NEURAL ESTABA MEDIADA EN SU TOTALIDAD POR MENSAJEROS QUÍMICOS DE BAJO PESO MOLECULAR (NEUROTRANSMISORES). LOS ESTUDIOS SOBRE EL SISTEMA ENDOCRINO Y LA COMUNICACIÓN HORMONAL, POR PRIMERA VEZ REVELARON QUE MACROMOLÉCULAS DEL TIPO DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS PUEDEN TAMBIÉN MEDIAR LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR. EN LOS AÑOS '70 SE ENCONTRÓ QUE MUCHOS DE ESTOS MENSAJEROS PROTEICOS SE HALLABAN TAMBIÉN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, LO CUÁL -- ABRIÓ LAS PUERTAS A LA INVESTIGACIÓN DE LA LIBERACIÓN NEURAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.

ESTE TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLÓ CON EL FÍN DE ALCANZAR 2 OBJETIVOS PRINCIPALES: A) OPTIMIZAR Y ADAPTAR LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN CEREBRAL IN VIVO, B) DESARROLLAR TÉCNICAS DE MEDICIÓN LO SUFICIENTEMENTE SENSIBLES COMO PARA MEDIR PROTEÍNAS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EN LOS PERFUSADOS OBTENIDOS DEL CEREBRO.

PARA LA PERFUSIÓN CEREBRAL IN VIVO UTILIZAMOS LA CÁNULA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN ORIGINALMENTE DESCRITA POR GADDUM (1960 1962), ADEMÁS DE OTRA CÁNULA DE TIPO GADDUM EN LA CUAL SE LLEVÓ A CABO UNA MODIFICACIÓN EN LA PUNTA (SE CUBRIÓ LA PUNTA DE LA CÁNULA DE INFUSIÓN MEDIANTE UN OJAL TALLADO EN EL TUBO DE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN). CON EL FÍN DE COMPARAR SU FUNCIONAMIENTO UTILIZAMOS 2 BOMBAS DE PERFUSIÓN, LA RECÍPROCANTE Y LA POLISTÁLTICA.

EN LO QUE RESPECTA A LOS 2 TIPOS DE CÁNULA UTILIZADOS, EN MANOS EXPERTAS NO SE OBSERVA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN CUAN-

TO A SU EFICIENCIA (SIN EMBARGO LA CÁNULA RANURADA OFRECE MAYORES PROBABILIDADES DE ÉXITO PARA EL QUE SE INICIA EN ESTA TÉCNICA). ALUDIENDO A LAS BOMBAS ES PREFERIBLE TRABAJAR CON LA POLISTÁLTICA CUYA VENTAJA PRINCIPAL SOBRE LA RECIPROCANTE ES LA DE MANTENER UN CURSO CONTÍNUO DE PERFUSIÓN.

EN REFERENCIA A LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, SE DESARROLLARON Y OPTIMIZARON LAS TÉCNICAS PARA DETERMINAR (EN PERFUSIONES DE CEREBRO) PROTEÍNAS, DESHIDROGENASA LÁCTICA, ACETILCOLINESTERASA Y PROTEASAS. LAS MACROMOLÉCULAS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTES MENCIONADAS SE PUEDEN UTILIZAR COMO MARCADORES DE LESIÓN CELULAR, ADEMÁS DE QUE LAS PROTEÍNAS Y LA ACTIVIDAD DE LA ACETILCOLINESTERASA PUEDEN OBTENERSE POR MEDIO DE LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA DEL TEJIDO CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ . ES PERTINENTE MENCIONAR QUE COMO MARCADOR DE VIABILIDAD CELULAR SE UTILIZÓ UN NEUROTRANSMISOR EXÓGENO (3H -GABA).

DE ACUERDO CON LO ANTERIOR EN ESTE TRABAJO QUEDA PLANTEADA UNA NUEVA PERSPECTIVA EN LA APLICACIÓN DEL ESTUDIO Y ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES MACROMOLÉCULAS ANTES MENCIONADAS.

INTRODUCCION

HACE 20 AÑOS SE PENSABA QUE LA COMUNICACIÓN QUÍMICA (A DIFERENCIA DE LA COMUNICACIÓN ELÉCTRICA), ESTABA MEDIADA EN SU TOTALIDAD POR MENSAJEROS QUÍMICOS DE BAJO PESO MOLECULAR (NEUROTRANSMISORES); CUYO SISTEMA DE SEÑALAMIENTO DEPENDÍA FUNDAMENTALMENTE DE LAS PROPIEDADES BIOELÉCTRICAS DE LAS MEMBRANAS. LOS ESTUDIOS SOBRE EL SISTEMA ENDOCRINO Y LOS MECANISMOS DE COMUNICACIÓN HORMONAL FUERON LOS QUE POR PRIMERA VEZ REVELARON QUE LAS MACROMOLÉCULAS (EN EL CASO DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS) PUEDEN TAMBIÉN MEDIAR LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR.

EL HALLAZGO EN LOS AÑOS '70 DE QUE MUCHOS, SI NO TODOS, DE ESTOS MENSAJEROS PROTEICOS SE ENCONTRABAN TAMBIÉN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (S.N.C.) ABRÍÓ LAS PUERTAS A LA INVESTIGACIÓN DE LA LIBERACIÓN NEURAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS. ESTUDIOS SOBRE LOS PROCESOS DE SECRECIÓN EN GLÁNDULAS ENDOCRINAS INDICABAN QUE PROTEÍNAS DE PESO MOLECULAR SUPERIOR AL DE LA MAYOR PARTE DE LAS HORMONAS PEPTÍDICAS CONOCIDAS, TAMBIÉN ERAN LIBERADAS COMO PARTE DEL MENSAJE ENDOCRINO (Vg. EN LA GLÁNDULA ADRENAL, CROMOGRANINAS Y AÚN ENZIMAS COMO LA DOPAMINA β -HIDROXILASA: DBH). ESTA POSIBILIDAD SE HA POSTULADO TAMBIÉN PARA LOS PROCESOS DE LIBERACIÓN EN EL TEJIDO NERVIOSO, DONDE SE HA ENCONTRADO QUE SE LIBERAN PROTEÍNAS SEMEJANTES. ASÍ, LA LITERATURA REPORTA QUE EN LAS NEURONAS SIMPÁTICAS, LA CROMOGRANINA "A" Y LA DBH SON LIBERADAS JUNTO CON EL NEUROTRANSMISOR NOR-ADRENALINA, DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS. POR OTRA PARTE ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO SOBRE LA LIBERACIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS (COMO ACETILCOLINESTE-

RASA, FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO E HIDROLASAS Y PROTEASAS QUE PROCESAN PÉPTIDOS NEUROACTIVOS) EN SISTEMA NERVIOSO (S.N.) SUGIEREN QUE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MACROMOLÉCULAS PROTEICAS LIBERADAS DEL CEREBRO, SERÁ IMPORTANTE PARA COMPRENDER NUEVAS MODALIDADES DE COMUNICACIÓN NEURAL. ESTO PERMITIRÁ EN SU MOMENTO INCORPORARLAS EN EL MARCO DE LAS ACCIONES DE LOS TRANSMISORES Y NEUROMODULADORES HOY CONOCIDOS. POR ELLO ES NECESARIO DESARROLLAR MÉTODOS Y ESTRATEGIAS QUE PERMITAN LA OBTENCIÓN Y LA CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL PROTEICO QUE SE LIBERA EN EL S.N.C.

DE ACUERDO CON LO ANTERIOR ESTE TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLÓ CON EL FÍN DE ALCANZAR 2 OBJETIVOS PRINCIPALES: EN PRIMER LUGAR OPTIMIZAR Y ADAPTAR LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN CEREBRAL IN VIVO PARA ESTUDIAR LA LIBERACIÓN DE NEUROPROTEÍNAS; EN SEGUNDO LUGAR DESARROLLAR TÉCNICAS DE MEDICIÓN LO SUFICIENTEMENTE SENSIBLES COMO PARA MEDIR PROTEÍNAS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EN LOS PERFUSADOS OBTENIDOS DEL CEREBRO. ADICIONALMENTE, NOS PROPUSIMOS OBTENER CON ESTA METODOLOGÍA INFORMACIÓN PRELIMINAR SOBRE LA LIBERACIÓN IN VIVO DE PROTEÍNAS Y ENZIMAS NEURALES QUE NOS PERMITIERA DISTINGUIR LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS NORMALES DE SECRECIÓN DE AQUELLOS RELACIONADOS CON DAÑO TISULAR PRODUCIDO DURANTE LA PERFUSIÓN.

LA DISCUSIÓN DE ESTOS RESULTADOS SE REALIZA EN FUNCIÓN DE LA IMPORTANCIA QUE TIENE EL DEMOSTRAR LA LIBERACIÓN FUNCIONAL DE MATERIAL PROTEICO AÚN NO IDENTIFICADO EN EL S.N.C.

ANTECEDENTES

PERFUSIÓN INTRACEREBRAL CON CÁNULAS DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN
(Ó CÁNULAS PUSH-PULL, AMBOS TÉRMINOS SE UTILIZARÁN INDISTINTAMENTE EN TODA LA TESIS).

LA MEDICIÓN "IN VIVO" DE ALTERACIONES EN LA CAPTACIÓN Y LIBERACIÓN DE SUBSTANCIAS PROVENIENTES DE ESTRUCTURAS CEREBRALES PROFUNDAS SE HA LLEVADO A CABO TRADICIONALMENTE POR EL MÉTODO DE PERFUSIÓN VENTRICULAR YA DESCRITO POR LEUSEN (1950), BATTACHARYA & FELDBERG (1958) Y PAPPENHEIMER & COL. (1962).

LAS CÁNULAS VENTRICULARES SON IMPLANTADAS EN REGIONES SEPARADAS DEL SISTEMA VENTRICULAR CEREBRAL, FUNCIONANDO UNA PARA INFUNDIR Y LA OTRA PARA EXTRAER EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) QUE SE ENCUENTRA EN LA CAVIDAD ENTRE AMBAS CÁNULAS. OTRA HERRAMIENTA DE PERFUSIÓN YA UTILIZADA ES LA LLAMADA COPA CORTICAL, LA CUÁL ES UNA CÁMARA QUE SE ADHIERE CRÓNICAMENTE A LA SUPERFICIE DEL CEREBRO Y CUENTA CON TUBERÍAS QUE PERMITEN LA INFUSIÓN Y EXTRACCIÓN DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN (MYERS, R.D. 1972; BELESLIN & MYERS, 1970).

LA PRINCIPAL DESVENTAJA DE ESTAS TÉCNICAS ES SIN EMBARGO LA IMPOSIBILIDAD DE USARLAS PARA EXAMINAR REGIONES CEREBRALES DISCRETAS LOCALIZADAS A ALGUNA DISTANCIA DEL LUMEN VENTRICULAR Ó LA CORTEZA CEREBRAL. EN ESTAS CIRCUNSTANCIAS LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN PUSH-PULL, ORIGINALMENTE DESCRITA POR GARDUM (1960, 1962) REPRESENTA UN AVANCE. ESTA TÉCNICA UTILIZA UNA CÁNULA CONCÉNTRICA (LOS DETALLES DE SU CONSTRUCCIÓN SE DESCRIBIRÁN EN LA SECCIÓN DE DESARROLLO EXPERIMENTAL), CUYA PRINCIPAL VENTAJA SOBRE LOS SISTEMAS DE PERFUSIÓN DESCRITOS

ANTES, ES LA POSIBILIDAD DE PERFUNDIR ESTRUCTURAS ESPECÍFICAS DEL PARÉNQUIMA CEREBRAL (SIN IMPORTAR SU PROFUNDIDAD). YA DESDE SU PRIMERA DESCRIPCIÓN NUMEROSOS INVESTIGADORES - HAN EMPLEADO ESTE MÉTODO PARA ESTUDIAR LA LIBERACIÓN DE POSIBLES NEUROTRANSMISORES TALES COMO LA ACETILCOLINA (ACH) - (MCLENNAN, 1964; MITCHEL & COL., 1962; MYERS & COL. 1970 - YAKSH & YAMAMURA, 1973) NOR-EPINEFRINA (NE) (CHASE & KOPIN, 1968; MYERS & COL., 1973; STEIN & WISE, 1969; SULSER & COL. 1969) Y 5-HIDROXITRIPTAMINA (MYERS & BELESLIN, 1969).

A PESAR DEL USO RELATIVAMENTE AMPLIO DE LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN, SE LE HA DADO Poca ATENCIÓN A LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA EFICIENCIA DEL SISTEMA DE PERFUSIÓN. EN SOLO 2 DÉCADAS, MYERS (1970, 1972), YAKSH & YAMAMURA (1974) Y BAYÓN & DRUCKER-COLÍN (1985) HAN REVISADO LA TEORÍA Y PRÁCTICA DE LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN. LAS MODIFICACIONES EN LA CÁNULA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN ORIGINALMENTE DESARROLLADA POR GADDUM, HAN PERMITIDO LA EXTRACCIÓN DE UNA VARIEDAD DE SUSTANCIAS DE SITIOS CEREBRALES ESPECÍFICOS DE ANIMALES EN LIBRE MOVIMIENTO (DRUCKER-COLÍN & COL., 1975).

ESTA POSIBILIDAD PERMITE CORRELACIONAR CIERTOS EVENTOS BIOQUÍMICOS CON FUNCIONES FISIOLÓGICAS Y CONDUCTUALES Y HA CONVERTIDO A LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL EN UNA HERRAMIENTA FUNDAMENTAL DE LA NEUROBIOLOGÍA MODERNA.

TOMANDO EN CUENTA QUE EN UNA PERFUSIÓN IN VIVO, LAS PRINCIPALES VARIABLES RESPONSABLES DE QUE SE PRODUZCA MAYOR Ó MENOR DAÑO AL TEJIDO, ES POR UN LADO EL SISTEMA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN (BOMBAS) Y POR OTRO EL TIPO DE CÁNULA A UTILIZAR

ENSEGUIDA SE HARÁ UN RESUMEN QUE NOS MUESTRA EL DESARROLLO QUE HASTA HOY SE HA LLEVADO A CABO EN AMBAS HERRAMIENTAS.

CÁNULAS DE PERFUSIÓN.- PARA LA REALIZACIÓN DE PERFUSIONES - INTRACEREBRALES SE HAN UTILIZADO DIFERENTES TIPOS DE CÁNULA. EN 1954 FELDBERG & SHERWOOD DESCRIBEN LA CÁNULA DE COLLISON (LA CUÁL SE ATORNILLABA DIRECTAMENTE EN EL CRÁNEO DEL ANIMAL). DELGADO & COL. (1964, 1966) PROPONEN EL SISTEMA DE LA CÁNULA YUXTAPUESTA, SIMILAR AL DISEÑO DE FOX & HILTON (1958). POR OTRO LADO BARTON & COL. (1969) DESCRIBEN EL USO DE CÁNULAS GUÍA QUE COLOCABAN EN LA CISTERNA MAGNA DE OVEJAS; EN EL MISMO AÑO SHARPE & MYERS EXPONEN EL MÉTODO DE LA IMPLANTACIÓN PERMANENTE DE SOLAMENTE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN, EN EL HIPOTÁLAMO DE MONOS. MYERS & COL. (1971B) LLEVABAN A CABO PERFUSIONES DE VENTRÍCULO DER. A VENTRÍCULO IZQ. COLOCANDO UNA CÁNULA EN CADA VENTRÍCULO (LA CUÁL SE ENCONTRABA DIRECTAMENTE FIJA EN EL CRÁNEO POR MEDIO DE CEMENTO ACRÍLICO).

EN LA ACTUALIDAD, EL MODELO DE CÁNULA QUE SE UTILIZA EN LAS PERFUSIONES CEREBRALES, ES BÁSICAMENTE EL DESCRITO POR GADDUM (1961) Y ADAPTADO POR MYERS (1970, 1972) (FIG. 1).

EN TRABAJOS ANTERIORES CON ESTE TIPO DE CÁNULA SE OBSERVÓ QUE DURANTE LA PERFUSIÓN HABÍA UNA ALTA INCIDENCIA DE OBSTRUCCIONES EN EL FLUJO, DEBIDAS PRINCIPALMENTE A FRAGMENTOS DE TEJIDO Y/O PEQUEÑOS COÁGULOS. CON EL FÍN DE DISMINUIR LA EROSIÓN DEL TEJIDO SE DISEÑARON MODELOS EN LOS CUÁLES LA PUNTA DE LA CÁNULA DE INFUSIÓN SE ENCONTRABA DENTRO DE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN (PHILIPPU & COL., 1973).

SIN EMBARGO ESTE MODELO NO LLEGA A SER EL IDEAL, YA QUE LA INTERFASE DE DIFUSIÓN EN LA PUNTA DE LA CÁNULA Y EL ÁREA DE TEJIDO A PERFUNDIR SE REDUCE, SIENDO NECESARIO EL USO DE TUBOS MÁS ANCHOS LOS CUÁLES NO SON ÚTILES PARA PERFUNDIR ANIMALES PEQUEÑOS (VG. RATAS).

EN ESTE TRABAJO DE TESIS, SE PRESENTARÁ EL MODELO DE CÁNULA GADDUM-MYERS MODIFICADA EN LA PUNTA.

BOMBAS DE PERFUSIÓN.- AL IGUAL QUE CON LAS CÁNULAS, SE HAN UTILIZADO DIFERENTES MODELOS DE BOMBEO PARA INFUNDIR Y EXTRAER EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL.

EN 1961 GADDUM SUGIRIÓ EL USO DE LA FUERZA DE GRAVEDAD PARA PROVEER A LA TUBERÍA DE EXTRACCIÓN, DE LA PRESIÓN NEGATIVA NECESARIA COMO PARA MANTENER UNA EXTRACCIÓN CONSTANTE DEL LÍQUIDO QUE SE INFUNDÍA. AL FALLAR EL SISTEMA EN CUANTO A MANTENER CONSTANTE LA SUCCIÓN; SE IDEÓ OTRO, CONSTITUIDO POR DOS JERINGAS CALIBRADAS Y MONTADAS EN UNA PLATAFORMA A UNA MISMA ALTURA Y EN OPOSICIÓN UNA CONTRA OTRA.

LAS JERINGAS SE MANTENÍAN JUNTAS Y LA VELOCIDAD DEL FLUJO - TANTO DE ENTRADA COMO DE SALIDA TAMBIÉN SE MANTENÍA CONSTANTE GRACIAS A UN MOTOR QUE SE ENCARGABA DE MOVER LA PLATAFORMA A LA VELOCIDAD DESEADA (MYERS 1970).

ASÍ SE LLEGÓ A LA BOMBA RECIPROCANTE, LA CUÁL FUNCIONA TAMBIÉN A BASE DE JERINGAS QUE ESTÁN EN CONTACTO CON PISTONES QUE SE DESLIZAN EN DIRECCIONES OPUESTAS Y, A UNA VELOCIDAD CONSTANTE QUE PUEDE SER PROGRAMADA MEDIANTE UN SELECTOR DE VELOCIDAD (DE ESTA FORMA LOS VOLÚMENES DE ENTRADA Y SALIDA SE MANTIENEN CONSTANTES).

ACTUALMENTE SE UTILIZAN LAS LLAMADAS BOMBAS POLISTÁLTICAS - (Ó PERISTÁLTICAS) LAS CUÁLES INFUNDEN Y EXTRAEN LÍQUIDO AL PRESIONAR PERISTÁLTICAMENTE TUBERÍAS DE SYLASTIC COLOCADAS SOBRE RODILLOS QUE GIRAN A LA VELOCIDAD ELEGIDA (CON ESTE TIPO DE BOMBAS SE MANTIENE UNA PRESIÓN CONSTANTE) (GREEN---FIELD & COL., 1983).

EN ALGUNAS OCASIONES LA EROSIÓN CELULAR ES PRODUCIDA POR UN EXCESO DE PRESIÓN NEGATIVA. CON EL FIN DE CONTINUAR EN LA BÚSQUEDA DE UN SISTEMA DE PERFUSIÓN ÓPTIMO SERÍA IMPORTANTE PROBAR UN SISTEMA ABIERTO (EN LA TUBERÍA PULL SE PRACTICA UN PEQUEÑO ORIFICIO, NIEOULLON & COL., 1977A); ESTE HIPOTÉTICAMENTE EVITARÍA UN EXCESO DE PRESIÓN NEGATIVA CUANDO SE PRESENTARA MAYOR SUCCIÓN DEL LÍQUIDO, EN COMPARACIÓN CON EL VOLUMEN QUE SE ESTUVIESE INTRODUCIENDO. DE ESTA MANERA SOLO TOMARÍA EL LÍQUIDO DISPONIBLE EN EL SITIO DE PERFUSIÓN ADEMÁS DE AIRE DEL EXTERIOR.

MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESIÓN Ó DE VIABILIDAD TISULAR.

LAS PERFUSIONES DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN, SE ENCUENTRAN DENTRO DE LOS MÉTODOS QUE AFECTAN AL SUJETO BAJO ESTUDIO, DE ALLÍ LA NECESIDAD DE INVESTIGAR EL EFECTO QUE TIENEN LAS MISMAS SOBRE LA VIABILIDAD DEL TEJIDO. POR LO COMÚN ESTE REQUISITO (CONOCER LA LESIÓN QUE PRODUCEN) HA SIDO SATISFECHO MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS FISIOLÓGICAS Ó ELECTROFISIOLÓGICAS, SIN EMBARGO NO TODOS LOS PROBLEMAS PODRÍAN SER DETECTADOS POR ESTOS MÉTODOS DE MONITOREO (YAKSH & YAMAMURA, 1974; HONCHAR & COL., 1979). DE ESTA MANERA LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS LIBERADOS EN LOS PERFUSADOS PUEDEN DAR INFORMACIÓN DE LA EROSIÓN Y, LAS LESIONES ACCIDENTALES QUE OCURREN DURAN-

TE UNA PERFUSIÓN; LAS MEDICIONES BIOQUÍMICAS ADEMÁS AYUDAN A DETERMINAR LA FUNCIONALIDAD DEL TEJIDO DURANTE EL CURSO DE UNA SESIÓN DE PERFUSIÓN PROBANDO SU CAPACIDAD PARA LIBERAR NEUROTRANSMISORES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS.

ESTÁ BIEN ESTABLECIDO QUE NEUROTRANSMISORES PUTATIVOS TALES COMO LA ACH, MONOAMINAS, CIERTOS AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y AÚN NUCLEOTIDOS SON LIBERADOS DE LAS CÉLULAS NERVIOSAS AL SER ESTIMULADAS FISIOLÓGICAMENTE. SIN EMBARGO, CONCOMITANTE MENTE CON LA LIBERACIÓN DE ESTOS COMPUESTOS CONOCIDOS OTRAS SUSTANCIAS DE ORIGEN NEURAL (VG. PROTEÍNAS) SON TAMBIÉN DETECTABLES EN LOS PERFUSADOS DE TEJIDO NERVIOSO Y PUEDEN EN PRINCIPIO SER USADOS COMO INDICADORES DE LA VIABILIDAD Ó DEL GRADO DE LESIÓN TISULAR.

PROTEÍNAS. - EN CUANTO A COMPUESTOS LIBERABLES, QUIZÁ EL FENÓMENO MÁS INTERESANTE Y FRECUENTEMENTE OBSERVADO ES LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS.

EN 1974 YAKSH & YAMAMURA UTILIZARON LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS PERFUSADOS COMO MARCADOR DE LESIÓN, SIENDO ESTO TOTALMENTE VÁLIDO YA QUE ESTÁN SIEMPRE PRESENTES Y SON FÁCILMENTE MEDIDAS EN LOS PERFUSADOS DEBIDO A QUE LOS NIVELES EN EL LÍQUIDO EXTRACELULAR DEL TEJIDO NERVIOSO, SON ALTOS (0.3%, VER HOFSTEIN & COL., 1983).

POR ESTA RAZÓN SOLO VARIACIONES MARCADAS (ELEVACIONES DEL DOBLE Ó MÁS SOBRE LA BASAL; EN AUSENCIA DE ESTÍMULO QUÍMICO Y/Ó ELÉCTRICO) EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE LOS PERFUSADOS SE HAN TOMADO COMO INDICADORAS DE DAÑO CELULAR.

LA PROTEÍNA S-100 (LLAMADA ASÍ DEBIDO A SU SOLUBILIDAD EN

SULFATO DE AMONIO AL 100% A PH NEUTRO) (BRADSHAW & SCHNEIDER 1980), PRESENTA CARACTERÍSTICAS QUE LA HACEN SER UN BUEN - MARCADOR DE DAÑO CELULAR. SU LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA SE LLEVÓ A CABO EN EL CITOPLASMA GLIAL, SIN EMBARGO ALGUNOS REPORTE HAN DEMOSTRADO LA PRESENCIA DE S-100 EN MEMBRANAS - NEURONALES (S INÁPTICAS Y NUCLEARES) ASÍ COMO EN EL NÚCLEO - GLIAL. ES POSIBLE QUE 2 Ó MÁS POBLACIONES DIFERENTES DE S-100, ESTÉN PRESENTES EN EL CEREBRO: UNA FRACCIÓN MENOR EN LAS MEMBRANAS NEURONALES Y, LA FRACCIÓN MAYOR EN EL CITO -- PLASMA GLIAL.

EXISTEN EVIDENCIAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS QUE FAVORECEN LA HIPÓTESIS DE QUE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS DE LA MÉDULA ADRENAL SE REALIZA MEDIANTE EL PROCESO DE EXOCITOSIS, EN CONJUNTO CON LA LIBERACIÓN DE TODOS LOS CONSTITUYENTES - SOLUBLES (PROTEÍNAS, ATP ETC.) DE LOS GRÁNULOS (DOUGLAS, W. W., 1968; SMITH, A.D., 1968).

LA PREGUNTA INMEDIATA SERÍA: OCURRE LO MISMO EN LAS TERMINALES DE LAS NEURONAS ADRENÉRGICAS?

EN 1969 DE POTTER & COL. ENCONTRARON QUE EN LAS SINAPSIS ADRENÉRGICAS, LA LIBERACIÓN DEL TRANSMISOR ES ACOMPAÑADA POR LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS LLAMADAS CROMOGRANINAS, LAS CUÁLES ESTÁN CONTENIDAS EN LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS.

LA CROMOGRANINA A Y LA DBH ESTÁN LOCALIZADAS JUNTO CON LA - NE EN VESÍCULAS GRANDES DE CORAZÓN ELECTRODENSO DE LAS NEURONAS ADRENÉRGICAS Y SU LIBERACIÓN ESTÁ POSITIVAMENTE CORRELACIONADA CON LA LIBERACIÓN DE NE (CUBEDDU & COL., 1974; GEFFEN & COL., 1970; GEWIRTZ & KOPIN, 1970; SMITH & COL., -- 1970; WEINSHILBOUM & COL., 1971). LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

EN LAS TERMINALES NERVIOSAS ADRENÉRGICAS HA PROVISTO UNA EN -
TRADA EN EL CONOCIMIENTO DEL MECANISMO DE LIBERACIÓN DE NE.
DE ACUERDO CON LO ANTERIOR MUSICK & HUBBARD (1972) SE PRE -
GUNTARON SI EN LAS SINAPSIS COLINÉRGICAS NO SE LIBERARÍAN -
TAMBIÉN PROTEÍNAS JUNTO CON EL NEUROTRANSMISOR (ACH), EN -
BUSCA DE RESPUESTA, REALIZARON EXPERIMENTOS EN PREPARACIO--
NES AISLADAS DE DIAFRAGMA-NERVIIO FRÉNICICO (BAÑADAS EN UN ME-
DIO ESPECÍFICO) Y, AL ESTIMULAR ELÉCTRICAMENTE EL NERVIIO OB -
TUVIERON LIBERACIÓN DE MATERIAL REACTIVO AL LOWRY (MRL); ES -
TO ÚLTIMO CONSTITUYE UNA EVIDENCIA MÁS DE LA LIBERACIÓN DE
MATERIAL PROTEICO A CONSECUENCIA DE ESTIMULACIÓN. EN 1975 -
DRUCKER-COLÍN & COL. DEMUESTRAN LA LIBERACIÓN FISIOLÓGICA -
(DURANTE LA FASE MOR DEL SUEÑO) DE MRL EN LA FORMACIÓN RETI -
CULAR MESENCÉFÁLICA EN ANIMALES PERFUNDIDOS IN VIVO.

ACETILCOLINESTERASA (ACHE). - EL MECANISMO DE LA NEUROTRANS -
MISIÓN COLINÉRGICA REQUIERE DE LA RÁPIDA INACTIVACIÓN DE -
LA ACH (DALE 1914).

LOEWI & NAVRATIL DEMOSTRARON EN 1926 QUE LA ACH PODÍA SER -
DESTRUÍDA POR UNA ENZIMA QUE EXISTE EN EXTRACTOS ACUOSOS DE
TEJIDO DE RANA. UNA ESTERASA QUE ESPECÍFICAMENTE HIDROLIZA
ESTERES DE COLINA FUÉ CARACTERIZADA EN SUERO DE CABALLO POR
STEDMAN & COL. (1932), LLAMÁNDOLA POR LO TANTO COLINESTERASA.
MÁS TARDE SE ENCONTRÓ QUE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS TAMBIÉN -
CONTIENEN UN ALTO NIVEL DE ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA ACH
(STEDMAN & STEDMAN, 1935).

ALLES & HAWES (1940) SUBSECUENTEMENTE ENCONTRARON QUE EN LA
SANGRE HUMANA, LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LAS CÉLULAS Y

LAS DEL SUERO SON CUALITATIVAMENTE DIFERENTES, MENDEL & COL. (1943A) DEMOSTRARON QUE MIENTRAS LA ENZIMA DEL SUERO HIDROLIZA BUTIRILCOLINA Ó PROPIONILCOLINA MÁS RÁPIDO QUE LA ACh; LA ENZIMA UNIDA A LA CÉLULA ACTÚA PREFERENCIALMENTE SOBRE LA ACh A UNA CONCENTRACIÓN BAJA DE SUSTRATO.

SE HA DEMOSTRADO AMPLIAMENTE QUE AMBAS ENZIMAS (COLINESTERASA Y AChE) SON POLIMÓRFICAS Y SE PRESENTAN TANTO EN ESTADO SOLUBLE COMO UNIDAS A LA MEMBRANA; AMBAS CONTIENEN GRUPOS HOMÓLOGOS DE FORMAS MOLECULARES, LOS CUÁLES POSEEN CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURAS CUATERNARIAS Y PROPIEDADES DE INTERACCIÓN. DE ESTA MANERA ES PROBABLE QUE ALGUNAS FORMAS SEAN FISIOLÓGICAMENTE ACTIVAS MIENTRAS QUE OTRAS CORRESPONDEN A SUS PRECURSORES BIOSINTÉTICOS Ó A SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.

AChE UNIDA A LA MEMBRANA.- LA POZA TOTAL DE LA ENZIMA UNIDA A LA MEMBRANA, NO PARTICIPA DEL FENÓMENO SECRETORIO. LA ENZIMA UNIDA A LA MEMBRANA TIENE UNA VIDA MEDIA DE 50 HRS. -- MIENTRAS QUE LA ENZIMA INTRACELULAR TIENE UN RECAMBIO RÁPIDO (2 A 3 HRS.). LA CANTIDAD DE ENZIMA UNIDA A LA MEMBRANA REPRESENTA UN TERCIO DE LA ENZIMA CELULAR TOTAL, SIN EMBARGO MENOS DE LA DÉCIMA PARTE DE LA AChE RECIENTE SINTETIZADA -- SE INCORPORA A LA MEMBRANA PLASMÁTICA (ROTUNDO & FAMBROUGH, 1980A, B). DE ESTA MANERA LA AChE SE PUEDE UTILIZAR COMO UN MARCADOR DE MEMBRANA Y ADEMÁS COMO UN MARCADOR DE LESIÓN CELULAR.

LIBERACIÓN POR ESTIMULACIÓN.- SMILOWITZ (1980) ESTUDIÓ LA PARTICIPACIÓN DE LOS IONÓFOROS (PARA IONES MONOVALENTES) SOBRE LA LIBERACIÓN DE AChE EN CULTIVO DE CÉLULAS MUSCULARES

DE POLLO Y CONCLUYÓ QUE REPRESENTA UN FENÓMENO SECRETORIO - REAL Y NO UN "DESPEGAMIENTO" DE LA ENZIMA UNIDA A LA MEMBRANA.

LA AChE ES LIBERADA PRINCIPALMENTE COMO LA FORMA G4 (FORMA GLOBULAR TETRAMÉRICA SIN BASTÓN) EN LA UNIÓN NEUROMUSCULAR. PROBABLEMENTE SE ORIGINA EN PARTE DE LA TERMINACIÓN NERVIOSA (SKAU & BRIMIJOIN, 1978) DONDE ES TRANSPORTADA POR EL FLUJO AXOPLÁSMICO, PERO TAMBIÉN DEL MÚSCULO MISMO COMO SE INDICÓ POR UNA LIBERACIÓN CONTÍNUA DE LA ENZIMA EN MÚSCULOS DENERVADOS (CARTER & BRIMIJOIN, 1980).

SE HA DEMOSTRADO TAMBIÉN LA PRESENCIA DE AChE EN LOS FLUIDOS EXTRACELULARES (PLASMA, LCR) DE VARIAS ESPECIES (AUGUSTINSSON, 1963) INCLUYENDO AL HOMBRE (JOHNSON & DOMINO 1971; PLATTNER & HINTNER, 1930; PLUM & FOG, 1960; SVENSMARK, 1961).

SE HA OBSERVADO ESTA ENZIMA EN EL LCR DE PERRO (BAREGGI & GIACOBINI, 1978), EN GATO (FUENMAYOR, SMITH & VOGT, 1976) Y EN CONEJO (CHUBB, GOODMAN & SMITH, 1976; GREENFIELD, CHUBB & SMITH, 1979).

EL ORIGEN DE LA AChE EN EL LCR NO HA SIDO AÚN DILUCIDADO LA POSIBILIDAD DE QUE LA AChE SEA SECRETADA POR LAS NEURONAS - SE HA ORIGINADO DE TRABAJOS PREVIOS EN LOS CUÁLES SE ENCONTRÓ QUE EL TEJIDO PERIFÉRICO INERVADO COLINÉRGICAMENTE (MÉDULA ADRENAL) PUEDE SECRETAR UNA ISOENZIMA DE LA AChE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON VARIOS AGENTES DEPOLARIZANTES (CHUBB & SMITH, 1974, 1975b), ADEMÁS CHUBB & COL. (1976) -- HAN PROPUESTO QUE PARTE DE LA AChE ENCONTRADA EN EL LCR ES LIBERADA DE NEURONAS COMO UN RESULTADO DE SU ACTIVIDAD; ESTA HIPÓTESIS SEGUIDA DE LA OBSERVACIÓN DE QUE LA CONCENTRA

CIÓN DE ACHÉ EN LCR DE CONEJO AUMENTA DESPUÉS DE PROCEDIMIENTOS (ESTIMULACIÓN NERVIOSA) QUE PROVOCAN LA LIBERACIÓN DE ACH EN CEREBRO (GREENFIELD & SMITH, 1976, 1979) SUGIEREN QUE BAJO CONDICIONES FISIOLÓGICAS EL TEJIDO NERVIOSO PERIFÉRICO, INCLUYENDO LAS NEURONAS COLINÉRGICAS CENTRALES CONTIENEN LA ENZIMA Y LA SECRETAN JUNTO CON EL NEUROTRANSMISOR -- ACH .

PROTEASAS. - LA EXISTENCIA DE DIFERENTES ACTIVIDADES DE PEPTIDASA SE HA INFERIDO BASÁNDOSE SOBRE LOS SITIOS DE CORTE - (EN LOS PRECURSORES) AMPLIAMENTE DEMOSTRADOS. ESTAS ACTIVIDADES DE PEPTIDASA (PROTEASAS) SE HAN CARACTERIZADO AMPLIAMENTE EN EL LUMEN LISOSOMAL, SITUACIÓN QUE PERMITE UTILIZAR A LAS PROTEASAS COMO MARCADORES DE LESIÓN.

EN CUANTO A SU POSIBLE LIBERACIÓN, HABRÍA QUE MENCIONAR QUE BROWNSTEIN & COL. (1980) POSTULAN LA PRESENCIA (EN LOS GRÁNULOS SECRETORIOS DE LAS TERMINALES NERVIOSAS DE LA PITUITARIA POSTERIOR DE RATAS) DE ENZIMAS RESPONSABLES DEL PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL DE LOS PRECURSORES HORMONALES. SIN EMBARGO SOLAMENTE EN CONTADAS EXCEPCIONES, LAS ENZIMAS QUE CATALIZAN ESTAS REACCIONES NO HAN SIDO AÚN PURIFICADAS Y CARACTERIZADAS CON RESPECTO A SU ESPECIFICIDAD. DE ESTA MANERA EL PAPEL DE LA ACCIÓN DE LAS PEPTIDASAS EN LA REGULACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS NEUROPEPTIDOS EN EL TEJIDO NERVIOSO, NO ESTÁ CLARO EN EL PRESENTE; SIN EMBARGO EXISTEN REPORTES DE LA PRESENCIA DE PROTEINASA NEUTRA (MARKS & LAJTHA, 1963) EN FRACCIÓN SINAPTOSOMAL.

LA CARACTERIZACIÓN, ESPECIALMENTE DE PROTEINASAS Y PEPTIDA-

SAS SE HA LLEVADO A CABO EN CEREBRO TOTAL (UZMAN & COL., - 1961; MARKS & LAJTHA, 1963, 1965, 1970; MARKS & COL. 1968). POR TODO LO EXPUESTO ANTERIORMENTE NO SERÍA SORPRENDENTE EN CONTRAR QUE JUNTO CON EL PÉPTIDO ACTIVO SE LIBERARA TAMBIÉN LA ENZIMA PROTEOLÍTICA ESPECÍFICA. ASÍ, ESTIMULADOS POR LOS ANTECEDENTES SE OPTÓ POR BUSCAR ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN LOS PERFUSADOS.

DESHIDROGENASA LÁCTICA. - EN LO QUE RESPECTA A LA DHL, COMO YA FUÉ DEMOSTRADO POR WRÓBLEWSKI & LA DUE (1955) SE TRATA - DE UNA ENZIMA DE "ESCAPE" ESTO ES, SU LOCALIZACIÓN ES INTRACELULAR Y NO SE ENCUENTRA FUERA DE LA CÉLULA A MENOS QUE ESTA SEA DESTRUIDA (HASTA AHORA NO SE HA DEMOSTRADO SU LIBERACIÓN FISIOLÓGICA). LOS NIVELES QUE LOS AUTORES PRESENTAN COMO NORMALES EN SUERO DE ADULTOS (260 A 850 U/ML CON UN PROMEDIO DE 470 ± 130 U/ML) REPRESENTAN EL RECAMBIO DIARIO CELULAR CON LA CORRESPONDIENTE DOTACIÓN DE DHL (Y OTRAS ENZIMAS) AL TORRENTE SANGUÍNEO; PROVENIENTE DE LAS CÉLULAS MUERTAS.

DE ACUERDO CON LO ANTERIOR SE PENSÓ QUE SE PODRÍA TOMAR A LA ACTIVIDAD DE DHL COMO UN MARCADOR DE LESIÓN, EL CUÁL PODRÍA ORIENTARNOS ACERCA DEL CURSO DE UNA PERFUSIÓN.

GABA Y ENCEFALINAS. - DE ACUERDO CON LO EXPUESTO ANTERIORMENTE UNA PERFUSIÓN SE PUEDE CALIFICAR DETECTANDO EL DAÑO CELULAR PRODUCIDO EN EL TRANSCURSO DE LA MISMA; PERO ESTO NO ES SUFICIENTE, HABRÍA QUE PROBAR TAMBIÉN LA FUNCIONALIDAD DEL TEJIDO. AUNQUE LA LIBERACIÓN DE ALGUNAS DE LAS PROTEÍNAS Y ENZIMAS ANTES MENCIONADAS ES UN POTENCIAL INDICADOR DE LA -

VIABILIDAD DEL TEJIDO, ESTA SE PUEDE PROBAR TAMBIÉN MEDIANTE LA LIBERACIÓN INDUCIDA DE TRANSMISORES QUÍMICOS POR AGENTES DEPOLARIZANTES (ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+).

YA QUE LOS GANGLIOS BASALES DEL CEREBRO SERÁN PRESENTADOS - MÁS ADELANTE COMO NUESTRO MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDIO. HE - MOS MEDIDO LA LIBERACIÓN DE TRANSMISORES ABUNDANTES EN ESTA REGIÓN (BAYÓN & COL., 1981).

DE ESTA MANERA LA LIBERACIÓN DE GABA EXÓGENO Y LA ENCEFALINA (ENTRE OTROS TRANSMISORES) PUEDEN SER UTILIZADOS COMO - MARCADORES DE VIABILIDAD QUE NOS INDICARAN EL BUEN CURSO DE UNA PERFUSIÓN IN VIVO.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) CONSIDERACIONES SOBRE ALGUNOS OBSERVABLES FÍSICOS COMO -
MARCADORES DE LESIÓN TISULAR DURANTE LA PERFUSIÓN Y, MODIFI-
CACIONES AL SISTEMA DE PERFUSIÓN CEREBRAL IN VIVO.

ALGUNOS DE LOS PROBLEMAS QUE MÁ S FRECUENTEMENTE SE PRE -
SENTARON EN LAS PERFUSIONES DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN, FUERON
LOS SIGUIENTES:

- 1) OBSTRUCCIÓN DEL FLUJO
- 2) DESEQUILIBRIO (AÚN TEMPORAL) EN EL IN-
FLUJO-EFLUJO DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.
- 3) SANGRADO DURANTE LA PERFUSIÓN.

1) LA OBSTRUCCIÓN DEL FLUJO PUEDE PRODUCIRSE POR FRAGMENTOS
DE TEJIDO, COÁGULOS DE SANGRE Y/Ó FIBRINA (PLASMA, EDEMA).
CAUSADO TODO LO ANTERIOR POR LA EROSIÓN DEL TEJIDO DURANTE
LA PERFUSIÓN.

CUANDO EXISTE OBSTRUCCIÓN, EL SIGNO MÁ S INMEDIATO SE PRESEN-
TA EN LA TUBERÍA DE EXTRACCIÓN; YA QUE EN LUGAR DE LÍQUIDO
SE OBSERVA AIRE. CUANDO LA OBSTRUCCIÓN ES PARCIAL SE PRESEN-
TAN SOLO BURBUJAS DE AIRE AISLADAS; EN CAMBIO CUANDO ES TO-
TAL, LA AUSENCIA DE LÍQUIDO ES ABSOLUTA EN LA TUBERÍA DE EX-
TRACCIÓN.

OTRO PARÁMETRO ÚTIL A ESTE RESPECTO ES LA MEDICIÓN DEL VOLU-
MEN DE COLECCIÓN, YA QUE DA UNA APRECIACIÓN CUANTITATIVA DE
LA GRAVEDAD DE LA OBSTRUCCIÓN; DEPENDIENDO DE LA MAGNITUD -
DE LA MISMA LAS CONSECUENCIAS PUEDEN SER LEVES, COMO UNA -
DISMINUCIÓN LIGERA DEL VOLUMEN DE COLECCIÓN CON EROSIÓN LE-
VE Y CONTÍNUA DEL TEJIDO; Ó INCLUSO EL ANIMAL PUEDE PRESEN-
TAR UNA CONDUCTA CONVULSIVA Y MUERTE, CUANDO LOS VOLÚMENES

ATRAPADOS EN LA ZONA DE PERFUSIÓN SE ENCUENTRAN ALREDEDOR - DE LOS 100 MICROLITROS.

2) EL DESEQUILIBRIO DE FLUJOS EN EL SISTEMA DE PERFUSIÓN - PUEDE SER DEBIDO A COÁGULOS Ó TEJIDO QUE OBSTRUYE PARCIAL-- MENTE LA LUZ DE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN Y/Ó DE INFUSIÓN.

ASÍ COMO A UN DESEQUILIBRIO ENTRE LA PRESIÓN DE LA BOMBA Y LA RESISTENCIA DEL SISTEMA BIOLÓGICO. TODO LO ANTERIOR DARÁ POR RESULTADO EN CASI EL 100% DE LOS CASOS LA LESIÓN AL TEJIDO EN LA ZONA DE PERFUSIÓN.

TOMANDO EN CUENTA LO ANTERIOR, LA MEDICIÓN DE LOS VOLÚMENES COLECTADOS ES ÚTIL PARA REALIZAR UNA EVALUACIÓN DINÁMICA Y TEMPORALMENTE PARALELA A LA PERFUSIÓN.

3) EL SANGRADO EN UNA PERFUSIÓN SE DEBE A LA RUPTURA DE VASOS Y, SE PRESENTA POR LO REGULAR CUANDO SE INTRODUCE LA CÁNULA Y/Ó CUANDO HAY MOVIMIENTO DE LA MISMA EN LA ZONA DE -- PERFUSIÓN.

NO PUEDE EVITARSE EL QUE SE LESIONEN ALGUNOS VASOS SANGUÍ - NEOS AL INTRODUCIR LA CÁNULA. LO QUE SI ES IMPORTANTE Y ADE MÁS SE PUEDE LOGRAR EN GRAN MEDIDA, ES EL EVITAR QUE LA CÁNULA UNA VEZ COLOCADA EN LA REGIÓN A PERFUNDIR CONTINÚE PRE SENTANDO MOVIMIENTOS; YA QUE ESTO ÚLTIMO IMPLICARÍA LESIÓN CONTÍNUA.

SOLUCIÓN Ó REDUCCIÓN DE LOS INCONVENIENTES ANTES DESCritos. CON RESPECTO AL PUNTO 1), EL TIPO DE CÁNULAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS SON DOS, LAS CUÁLES PRÁCTICAMENTE SO LO SE DIFERENCIAN EN LA PUNTA. A UNA LA DENOMINAMOS CÁNULA GADDUM Ó TRADICIONAL (FIG. 1) Y, LA OTRA ES LA CÁNULA MODI-

FICADA EN OJAL Ó RANURADA (FIG. 2).

EN LA CONSTRUCCIÓN DE LAS CÁNULAS SE UTILIZAN TUBOS DE DIFERENTES DIÁMETRO. EL TUBO DE LA CÁNULA MÁS EXTERNA Ó DE EXTRACCIÓN TIENE UN DIÁMETRO DEL NÚMERO 21 (GA), MIENTRAS QUE LA CÁNULA INTERNA Ó DE INFUSIÓN TIENE UN DIÁMETRO DEL NÚMERO 29 (GA). EN LA CÁNULA TRADICIONAL, LA PUNTA DE LA TUBERÍA DE INFUSIÓN PROTRUYE A TRAVÉS DE LA TUBERÍA DE EXTRACCIÓN UNA LONGITUD DE UNO A DOS MM (FIG. 1).

CONSIDERANDO EL PROBLEMA DE EROSIÓN AL TEJIDO Y OBSTRUCCIÓN DE LA CÁNULA, LA SOLUCIÓN QUE SE PLANTEA AQUÍ ES CUBRIR LA PUNTA DE LA CÁNULA TRADICIONAL PARA EVITAR LA INCRUSTACIÓN DE CUALQUIER CUERPO EXTRAÑO (COÁGULO, TEJIDO ETC.). DE ESTA MANERA, EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA CÁNULA RANURADA ANTES DE ENSAMBLAR LOS TUBOS EXTERNOS E INTERNOS CON EL FÍN DE FORMAR UN SISTEMA CONCÉNTRICO GADDUM-MYERS, EL TUBO DE EXTRACCIÓN ES OBSTRUÍDO EN LA PUNTA CON MATERIAL PARA SOLDAR Y DOS OJALES SON TALLADOS BAJO CONTROL MICROSCÓPICO A CADA LADO DEL TUBO JUSTAMENTE SOBRE LA PUNTA (FIG. 2). EL NÚMERO Y LONGITUD DE OJALES PUEDE VARIAR DEPENDIENDO DEL TAMAÑO DE LA REGIÓN A PERFUNDIR POR EJ., PARA EL ÓRGANO VASCULAR PERIVENTRICULAR DEL POLLO (QUE SE ENCUENTRA EN LA PARED DEL TERCER VENTRÍCULO) SE UTILIZA UNA CÁNULA CON UN SOLO OJAL.

EN CUANTO A LA LONGITUD TOTAL DE LA CÁNULA ESTA DEPENDE DE LA REGIÓN A PERFUNDIR Y POR SUPUESTO DEL TIPO DE ANIMAL EXPERIMENTAL.

A PESAR DE QUE TEÓRICAMENTE ESTE NUEVO DISEÑO EN LA PUNTA DE LA CÁNULA PRESENTARÍA VARIAS VENTAJAS, TENDRÍA TAMBIÉN ALGUNOS INCONVENIENTES DEBIDO A QUE EL ÁREA DE CONTACTO CON

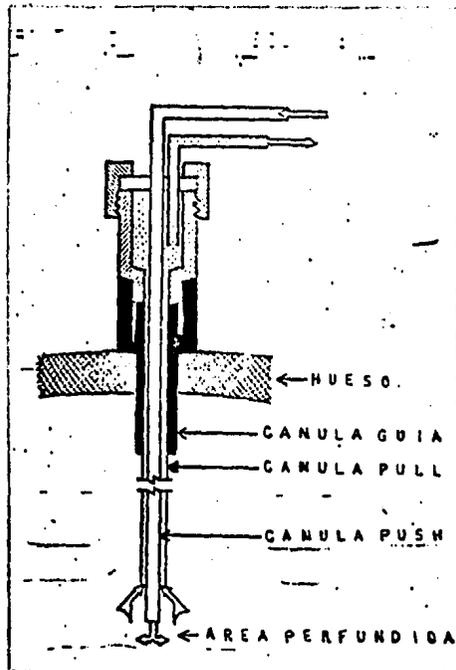


FIGURA 1.- CÁNULA PUSH-PULL, GADDUM MYERS. LOS SISTEMAS DE TUBOS (INTERIOR BLANCO Y EXTERIOR SOMBREADO) - SE ENCUENTRAN CONCÉNTRICOS A LO LARGO DE LA PUNTA DE LA CÁNULA, PERO - SE SEPARAN UNA VEZ QUE ENTRAN EN LA CÁMARA SUPERIOR, LA CUAL ESTÁ CONSTRUÍDA DE DOS PIEZAS ATORNILLADAS - DE ACERO INOXIDABLE (SOMBREADO) Y UN SELLO DE HULE (BLANCO). LA CÁNULA GUÍA USADA EN EL LABORATORIO, - PRÁCTICAMENTE FUNCIONA COMO UN DISPOSITIVO QUE PINZA A LA CÁNULA PUSH-PULL. LA CÁNULA PUSH PROTRUYE DE LA CÁNULA PULL. 19

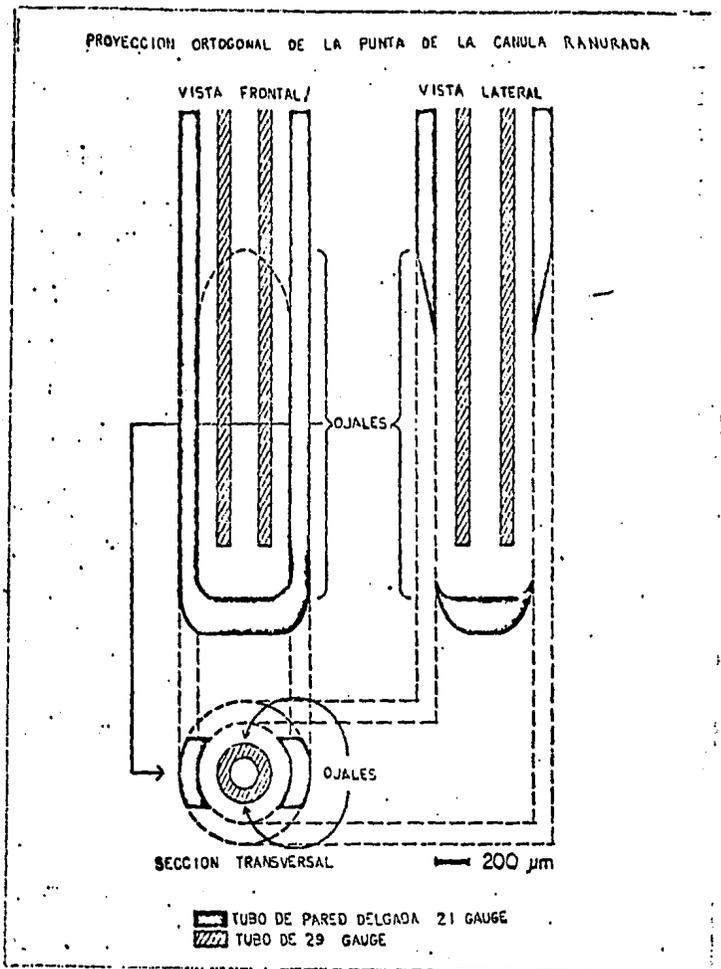


FIGURA 2.- LA MODIFICACIÓN EN OJAL DE LA PUNTA DE LA CÁNULA PUSH-PULL SE MUESTRA EN ESTA FIGURA . EL DISEÑO ESTÁ HECHO A ESCALA, MOSTRANDO LA CÁNULA DE DOBLE OJAL UTILIZADA EN ESTE TRABAJO.

EL TEJIDO SE VE REDUCIDA, ASÍ POR EJ. SE ESPERARÍA QUE LA EFICIENCIA DE MUESTREO Y/O INTRODUCCIÓN DE SOLUTOS DISMINUYERA. ESTO ÚLTIMO SE COMPROBARÁ Ó DESCARTARÁ POSTERIORMENTE - CON EL USO DE MARCADORES.

2) CON EL FÍN DE SELECCIONAR UN SISTEMA DE INFLUJO-EFLUJO - QUE NOS AYUDARA A RESOLVER SI NO COMPLETAMENTE, POR LO MENOS EN GRAN PARTE EL PROBLEMA EN EL DESEQUILIBRIO DE FLUJOS SE UTILIZARON DOS DIFERENTES BOMBAS DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN UNA FUÉ LA BOMBA DE JERINGAS Ó RECIPROCANTE (FIG. 3) Y LA OTRA FUÉ LA BOMBA POLISTÁLTICA Ó PERISTÁLTICA (FIG. 4), QUE COMO SU NOMBRE LO INDICA INTRODUCE Y SACA LÍQUIDO POR MEDIO DE MOVIMIENTOS PERISTÁLTICOS.

PARA AMBOS TIPOS DE BOMBA ES VÁLIDA LA REGLA DE QUE EL MISMO VOLUMEN QUE SE INTRODUCE EN EL CEREBRO DEL ANIMAL DEBE - SALIR YA QUE CUALQUIER RETENCIÓN DE LÍQUIDO PRODUCE UNA SERIA LESIÓN.

UNA DE LAS PRUEBAS QUE SE UTILIZARON PARA VERIFICAR EL EQUILIBRIO ENTRE LOS TUBOS DE INFUSIÓN Y EXTRACCIÓN FUÉ LA SIGUIENTE: UNA VEZ QUE SE HUBO MONTADO EL SISTEMA, ESTO ES LA CONEXIÓN DE LA CÁNULA EN SU ENTRADA (INFUSIÓN) Y SALIDA (EXTRACCIÓN) MEDIANTE TUBERÍA DE POLIETILENO Y/O SYLASTIC CON LA RESPECTIVA ENTRADA Y SALIDA DE LA BOMBA Y YA LLENAS LAS TUBERÍAS CON EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN (NA₂CO₃ 130.7 MM, CA₂CL₂ (H₂O)₂ 1.8 M, MGSO₄ (7H₂O) 1.18 M, NAHCO₃ 20 M, D-GLUCOSA - 2 G/L). SE COLOCA UNA PEQUEÑA GOTA EN LA PUNTA DE LA CÁNULA Y SE ECHA A ANDAR EL SISTEMA, SI ESTA GOTA NO SE CAE, NI VARÍA SU TAMAÑO DESPUÉS DE 30 MIN. ENTONCES PUEDE DECIRSE QUE EL SISTEMA ESTÁ EN EQUILIBRIO.

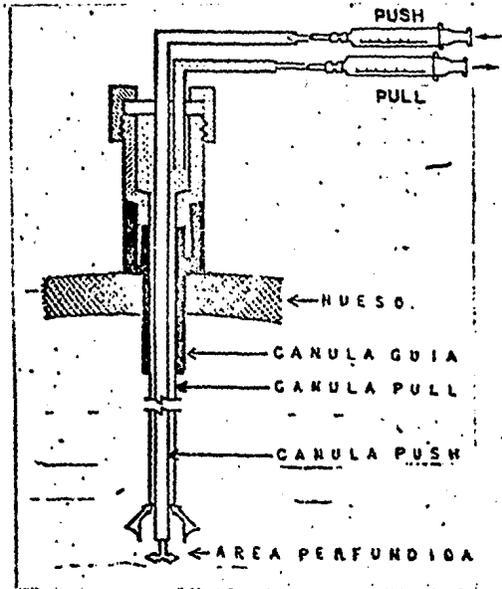


FIGURA 3.- AQUÍ SE ESQUEMATIZA EL SISTEMA DE PERFUSIÓN QUE UTILIZA LA BOMBA RECIPROCANTE. A LAS JERINGAS, 2 EN TOTAL; SE ENCUENTRA CONECTADA LA CÁNULA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN MEDIANTE UNA TUBERÍA DE POLIETILENO. LA POSIBILIDAD DE LA ENTRADA DE AIRE EN LA TUBERÍA DE EXTRACCIÓN SE PUEDE DISMINUIR APLICANDO UNA PEQUEÑA CANTIDAD DE SILICÓN EN EL ÉMBOLO DE LA JERINGA.

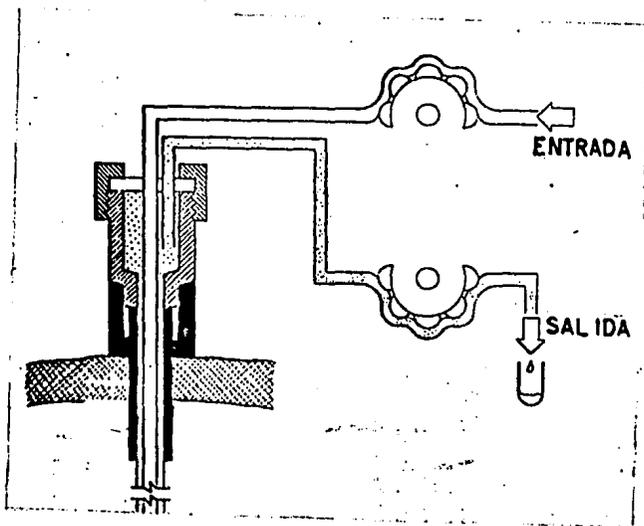


FIGURA 4.- BOMBA POLISTÁLTICA, COMO SU NOMBRE LO INDICA ESTA BOMBA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN, FUNCIONA MEDIANTE UN SISTEMA DE RODILLOS Y CASSETTES QUE AL GIRAR ENVÍAN EN UNO Y OTRO SENTIDO, EL LÍQUIDO QUE SE ENCUENTRA DENTRO DE UNA TUBERÍA DE SYLASS-TIC.

LA VELOCIDAD DE PERFUSIÓN FUÉ EN PROMEDIO DE 29 MICROLITROS POR MINUTO Y, MEDIANTE LA TINCIÓN DE LA ZONA DE PERFUSIÓN CON AZUL DE EVANS SE ÓBSERVÓ QUE LA MISMA TIENE UN DIÁMETRO DE 1 A 1.5 MM.

MÁS ADELANTE SE ENUMERARÁN LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE CUALQUIERA DE LAS 2 BOMBAS (LA DE JERINGAS Ó LA POLISTÁLTICA).

3) COMO YA SE MENCIONÓ EL SANGRADO ES CASI INEVITABLE AL INSERTAR LA CÁNULA Y/Ó AL PRODUCIR LESIÓN MECÁNICA LA CUAL CONSISTE EN EXTRAER Y VOLVER A INTRODUCIR LA CÁNULA, LO ANTERIOR NOS LLEVA A PENSAR QUE CUALQUIER MOVIMIENTO DE LA CÁNULA, YA SEA ROTATORIO Y/Ó VERTICAL PRODUCE UNA LESIÓN QUE ES BIEN POSIBLE SE MANIFIESTE CON SANGRADO.

ANTERIORMENTE EN LAS PRIMERAS PERFUSIONES UTILIZAMOS TUBOS GUÍA QUE NO SUJETABAN LA CÁNULA POR SÍ MISMOS, SINO QUE HABÍA QUE FIJARLA AL TUBO GUÍA MEDIANTE TELA ADHESIVA.

POR LO TANTO ESTABA A MERCED DE LOS MOVIMIENTOS DEL ANIMAL EN PERFUSIÓN Y, CUALQUIER CABECEADA Ó MOVIMIENTO BRUSCO PODÍA PRODUCIR UNA LESIÓN EN LA ZONA DE PERFUSIÓN (LO CUAL SE OBSERVÓ EN LA MAYORÍA DE LOS EXPERIMENTOS). POR LO ANTERIORMENTE EXPUESTO SE PENSÓ EN LA POSIBILIDAD DE CONSTRUIR UNA GUÍA QUE A LA VEZ SUJETARA A LA CÁNULA (A MANERA DE PINZA) IMPIDIENDOLE ASÍ CUALQUIER MOVIMIENTO (FIG. 1).

LA IMPLANTACIÓN DE LA CÁNULA GUÍA SE LLEVA A CABO ESTEREOTÁXICAMENTE. LAS CÁNULAS SON DE ACERO INOXIDABLE CON UN DIÁMETRO DE 18 GA, SE FIJAN DE FORMA PERMANENTE AL CRÁNEO MEDIANTE CEMENTO ACRÍLICO Y SIRVEN COMO GUÍA PARA LA INSERCIÓN AGUDA DE LA CÁNULA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN. LA LUZ DEL

TUBO GUÍA SE OBLITERA MEDIANTE UN MANDRIL PROTECTOR.

EN REFERENCIA A LA ZONA DEL S.N.C. EN QUE SE LLEVARON A CABO LAS PERFUSIONES; SE ELIGIÓ EL ESTRIADO POR LAS SIGUIENTES RAZONES: ES BIEN SABIDO QUE EL GP ES UNA REGIÓN RICA EN CUANTO A CONTENIDO DE ENCEFALINAS Y DEL NEUROTRANSMISOR GABA. EN CUANTO AL CAUDADO, YA GREENFIELD & COL. (1980) HABÍAN DEMOSTRADO LA LIBERACIÓN DE AChE EN NÚCLEO CAUDADO DE GATO; POR LO QUE SE DECIDIÓ BUSCAR LA LIBERACIÓN DE LA ENZ1MA EN S.N.C. DE RATA Y UTILIZARLA COMO MARCADOR BIOLÓGICO.

B) TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE PROTEÍNAS Y ENZIMAS EN PERFUSADOS DE CEREBRO: DESARROLLO METODOLÓGICO.

1) LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA LÁCTICA (DHL) SE DETERMINÓ DE ACUERDO AL MÉTODO DE BERGMAYER, 1974 Y SIDNEY & COL., 1955, CON ALGUNAS MODIFICACIONES PARA OPTIMIZAR LA MEDICIÓN.

MEZCLA DE REACCIÓN.- BUFFER PO4 (0.05 M, PH 7.5), NICOTÍN ADENÍN DINUCLEÓTIDO REDUCIDO (NADH, CONCENTRACIÓN FINAL 0.17MM), PIRUVATO (CONCENTRACIÓN FINAL 0.3MM), MUESTRA BIOLÓGICA.

PARA OBTENER UNIDADES DE REFERENCIA CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, SE UTILIZÓ EL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR PARA EL NADH QUE ES IGUAL A 6220

$$\frac{\text{UMOLES}}{\text{MIN.}} = \frac{\text{ABS.}}{\text{MIN.}} \times \frac{1}{10.36} *$$

$$* \frac{\text{UMOLES}}{\text{MIN.}} = \frac{\text{ABS.}}{\text{MIN.}} \times \frac{\text{VOLUMEN DE REACCIÓN}}{6.22}$$

$$\times \frac{0.6}{6.22} = \frac{1}{10.36}$$

$$\text{UNA UNIDAD INTERNACIONAL} = \frac{1 \text{ UMOLA}}{\text{MIN.}}$$

EN LO QUE RESPECTA A LA OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA DHL FUE BASTANTE LABORIOSA, YA QUE LA ACTIVIDAD A MEDIR ES APENAS DETECTABLE POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS Y, POR LO MISMO ES REQUERIMIENTO INDISPENSABLE QUE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO SEA LO SUFICIENTEMENTE BUENA COMO PARA DE-

TECTAR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LAS MUESTRAS DE PERFUSIÓN. EL PASO DE NADH PARA NAD⁺ PUEDE MEDIRSE TAMBIÉN POR FLUOROMETRÍA, SIENDO ESTE MÉTODO MUCHO MÁS SENSIBLE. LA RAZÓN POR LA CUAL NO HICIMOS USO DEL MISMO, FUE PORQUE NO TENÍAMOS ACCESO CONSTANTE A UN FLUORÓMETRO.

PARA OBTENER UN ENSAYO ENZIMÁTICO CON LA SENSIBILIDAD DESEADA SE LLEVARON A CABO LAS SIGUIENTES MODIFICACIONES:

- SE REDUJERON LOS VOLÚMENES ORIGINALES DE LOS REACTIVOS EN EL ENSAYO ENZIMÁTICO (ASÍ, REDUCIENDO EN MAYOR PROPORCIÓN EL VOLUMEN TOTAL DEL ENSAYO, EN COMPARACIÓN CON EL VOLUMEN DE LA MUESTRA, AUMENTAMOS LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA).

	ORIGINAL	MODIFICADO
BUFFER P04	2.8 ML	0.5 ML
NADH	0.05ML/2.5	0.02 ML
MUESTRA BIOLÓGICA	0.10 ML	0.06 ML
PIRUVATO	<u>0.05ML/2.5</u> 3.00 ML/5	<u>0.02 ML</u> 0.60 ML

PARA OBTENER UNA CURVA DE CINÉTICA ENZIMÁTICA (A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA) SE HIZO LO SIGUIENTE:

- A RATAS ALBINAS (WISTAR), CON UN PESO DE 150 A 200 G. SE LES EXTRAE EL GP.

- HOMOGENIZACIÓN DE LOS GLOBOS PÁLIDOS EN RINGER KREBS (DILUCIÓN 1:10 PESO/VOLUMEN).

PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LA DHL, TANTO EN HOMOGENADO (TOTAL) COMO EN SOBRENADANTE (SOLUBLE); SE LLEVARON A CABO DIFERENTES DILUCIONES DEL HOMOGENADO, HASTA OBTENER VOLÚMENES DESDE 0.001 A 1 MICROLITRO. PARA OBTENER EL SOBRENADANTE, SE CENTRIFUGÓ EL HOMOGENADO A 3,000 RPM DURANTE U-

NA HORA Y; EN EL MISMO TAMBIÉN SE LLEVARON A CABO DIFERENTES DILUCIONES HASTA OBTENER VOLÚMENES DE 0.001 A 20 MICROLITROS.

- LA REACCIÓN ENZIMÁTICA SE ECHABA A ANDAR AL AGREGAR YA SEA EL HOMOGENADO Ó EL SOBRENADANTE (EL STOCK DE LA MUESTRA BIOLÓGICA SE MANTENÍA A TEMPERATURA DE HIELO, PERO UNA VEZ INICIADA LA REACCIÓN, ESTA SE DEJABA CORRER A TEMPERATURA AMBIENTE). EN UN PRINCIPIO LA CINÉTICA FUÉ DE 10 MIN. EN TOTAL (LEYENDO CADA MIN.) PERO SE OBSERVÓ QUE EN LOS PERFUSADOS DE ALGUNOS ANIMALES PRÁCTICAMENTE NO SE DETECTABA ACTIVIDAD DE LA DHL (FIG. 11). CON EL FÍN DE OBTENER UNA MAYOR SENSIBILIDAD, LAS LECTURAS SE FUERON TOMANDO CADA VEZ A TIEMPOS MÁS LARGOS (45 MIN., UNA HORA) HASTA LLEGAR A LA TOMA DE LECTURA DENTRO DE UN PERIODO DE 24 HRS. (DENTRO DE ESTE PERIODO, DESPUÉS DE INICIADA LA REACCIÓN ENZIMÁTICA; LAS LECTURAS SE LLEVARON A CABO A LOS 2 MIN., 2, 4, 6, 8 Y 24 HRS.). ASÍ, ALARGANDO LOS TIEMPOS DE LECTURA SE LOGRÓ MEJORAR LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. SOLO QUE LAS CINÉTICAS A LARGO PLAZO PRESENTARON UN NUEVO INCONVENIENTE, AL LLEVAR A CABO REACCIONES EN LAS QUE SOLO SE MEZCLÓ BUFFER Y NADH OMITIÉNDOSE POR LO TANTO EL PIRÚVICO Y LA ENZIMA, SE OBSERVÓ DE TODAS MANERAS UNA PENDIENTE QUE AUNQUE MÍNIMA REPRESENTABA UNA OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA DEL NADH QUE ENMASCARABA CUALQUIER ACTIVIDAD IGUAL Ó MENOR A ELLA (FIG. 12), POR LO MISMO SE DECIDIÓ CORRER UN BLANCO EN CADA ENSAYO ENZIMÁTICO A FÍN DE RESTARLO DE LA ACTIVIDAD TOTAL MEDIDA. EN LA FIG. 13 SE PUEDE OBSERVAR LA CURVA PATRÓN DE LA DHL, RESULTADO DE LA MEDI --

CIÓN CON EL MÉTODO YA MODIFICADO PARA OBTENER UNA MAYOR SEN
SIBILIDAD.

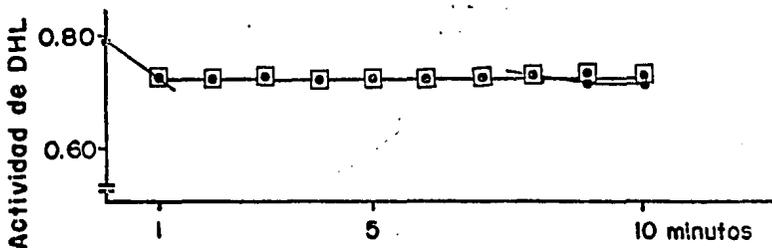


FIGURA 11

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE DHL A PERFUSADOS DE LA REGIÓN DEL ESTRIADO EN GATOS. CINÉTICAS DE 10 MINUTOS.

EN LAS ORDENADAS, UNIDADES DE DENSIDAD ÓPTICA Y EN LAS ABSCISAS, EL TIEMPO EN QUE SE LLEVÓ A CABO EL ENSAYO.

(o) TUBO 1 .

(□) TUBO 5 .

NOTA.- LA PENDIENTE INICIAL ES EL RESULTADO DE UN EFECTO DE DILUCIÓN.

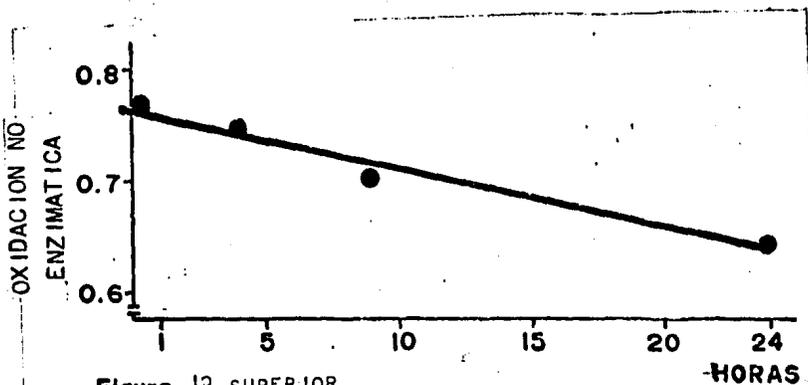


Figura 12 SUPERIOR.

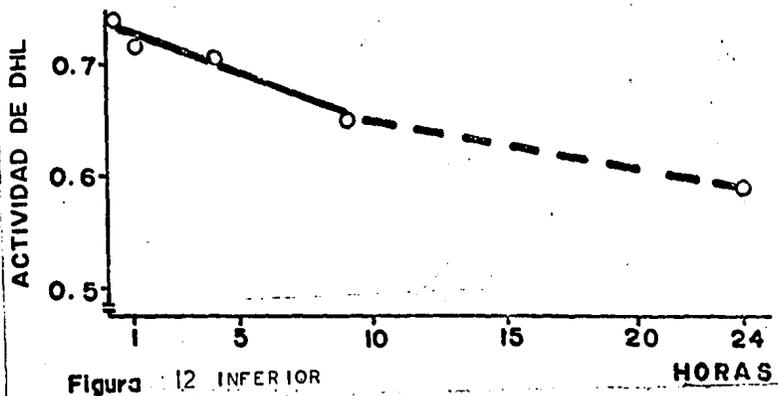


Figura 12 INFERIOR

EN LA GRÁFICA SUP. SE PUEDE OBSERVAR CLARAMENTE LA OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA DEL NADH.

LA GRÁFICA INF. PRESENTA UNA CINÉTICA ENZIMÁTICA REALIZADA EN 24 HRS., CON 5 LECTURAS; LA PRIMERA A LOS 2 MINUTOS DE INICIADA LA REACCIÓN Y LA ÚLTIMA A LAS 24 HRS. ESTA CINÉTICA SE LLEVÓ A CABO EN PERFUSADO DE CEREBRO DE RATA (COMO FUENTE DE ENZIMA) Y SE OBSERVA UNA CLARA PENDIENTE DEMOSTRATIVA DE LA PRESENCIA DE ACTIVIDAD DE DHL EN ESE PERFUSADO.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS UNIDADES DE DENSIDAD ÓPTICA Y EN LAS ABCISAS EL TIEMPO EN QUE SE EFECTUÓ LA MEDICIÓN.

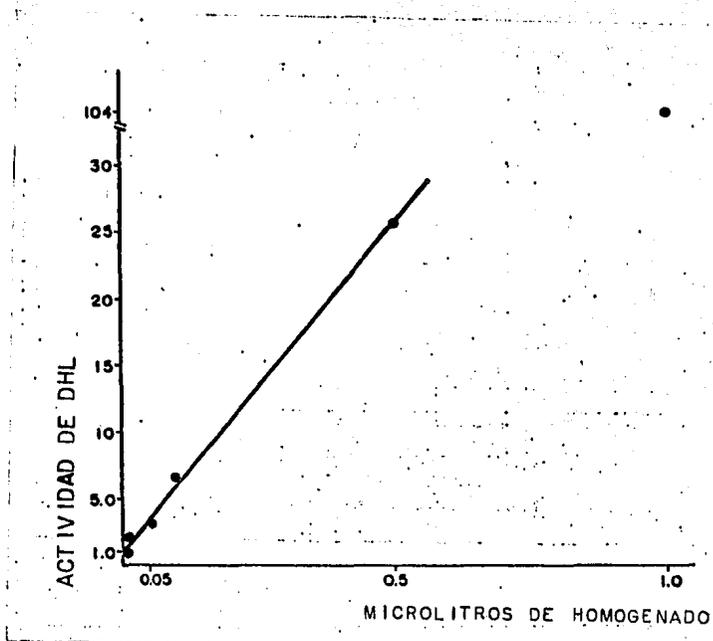


FIGURA 13

CURVA PATRÓN DE LA ACTIVIDAD DE DHL REALIZADA A DIFERENTES VOLÚMENES DE HOMOGENADO DE GLOBO PÁLIDO DE RATA DESDE 0.01 UL HASTA 1.0 UL - (MEDICIONES REALIZADAS EN LAPSOS DE 24 HRS.).

EN LAS ORDENADAS TENEMOS LOS VALORES DE LA ACTIVIDAD DE DHL EN UNIDADES INTERNACIONALES/ML DE PERFUSADO POR 10^{-4} .

EN LAS ABCISAS LOS VOLÚMENES DEL HOMOGENADO.

2) LA ACTIVIDAD DE LA ACETILCOLINESTERASA (ACHE) SE DETERMINÓ DE ACUERDO AL MÉTODO DE ELLMAN & COL., 1961 (SE REALIZARON ALGUNAS MODIFICACIONES PARA OPTIMIZAR LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO).

MEZCLA DE REACCIÓN.- BUFFER FOSFATO (PO4) (0.1 M, PH 8), DITIOBISNITROBENZOATO (DTNB) (0.01 M), IODURO DE ACETILTIOCOLINA (0.075 M), MUESTRA BIOLÓGICA.

PARA HACER LOS CÁLCULOS UTILIZAMOS EL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR DEL COMPUESTO COLORIDO FORMADO, QUE ES IGUAL A 1.36×10^4

$$\frac{\Delta \text{UMOLAS}}{\text{MIN.}} = \frac{\Delta \text{A/MIN}}{\text{MIN.}}$$

$$\frac{\Delta \text{UMOLAS}}{\text{MIN.}} = \text{UNIDADES ABSOLUTAS (ELLMAN \& COL., 1961)}$$

PARA LA OPRIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ACHE TAMBIÉN SE LLEVARON A CABO CIERTAS MODIFICACIONES AL MÉTODO ORIGINAL.

PARA EMPEZAR, AL IGUAL QUE CON LA DHL SE DISMINUYERON LOS VOLÚMENES ORIGINALES; CON EXCEPCIÓN DEL VOLUMEN CORRESPONDIENTE A LA FUENTE DE ENZIMA (DE ESTA MANERA SE AUMENTÓ MÁS DE 10 VECES LA SENSIBILIDAD DEL ENSAYO).

	ORIGINAL	MODIFICADO
BUFFER PO4	2.9 ML	0.384 ML
DTNB	0.1 ML	0.02 ML
FUENTE DE ENZIMA	0.1 ML	0.1 ML
ACETILTIOCOLINA (ATIOCH)	0.02 ML	0.02 ML (6 VECES DILUÍDA LA CONCENTRACIÓN ORIGINAL)

LAS DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS SE LLEVARON A CABO AL PRINCIPIO EN LAPROS DE 10 MIN. (TOMANDO LECTURA CADA MINUTO) - (FIG. 14), POSTERIORMENTE EN BÚSQUEDA DE UNA MAYOR SENSIBILIDAD DEL MÉTODO SE REALIZARON LECTURAS EN LAPROS DE 24 - HRS., TOMANDO LECTURA A LOS 2 MIN. DE INICIADA LA REACCIÓN A LA HORA, 3, 5, 8 Y 24 HRS. (FIG. 15).

AL IGUAL QUE EN LA METODOLOGÍA PARA DETERMINAR DHL TAMBIÉN SE CORRIÓ UN BLANCO EN EL QUE SE ENCONTRABAN TODOS LOS COMPONENTES CON EXCEPCIÓN DE LA FUENTE DE ENZIMA, OBSERVÁNDOSE UNA PEQUEÑA PENDIENTE QUE REPRESENTA LA HIDRÓLISIS NO - ENZIMÁTICA (FIG. 15).

EN LA FIG. 16 TENEMOS 2 CURVAS PATRÓN CORRESPONDIENTES A - DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SOBRENADANTE Y HOMOGENADO - DE CABEZAS DE CAUDADO DE RATA.

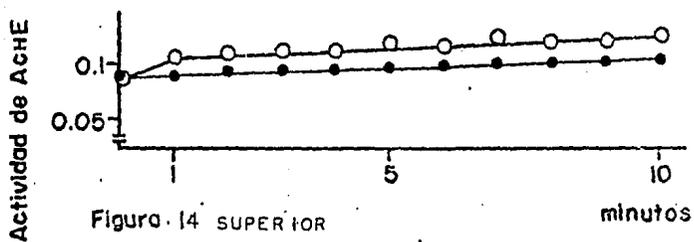


Figura 14 SUPERIOR

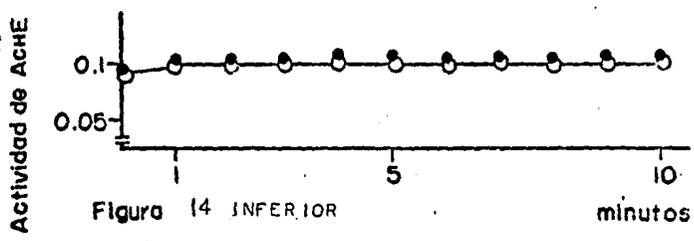


Figura 14 INFERIOR

LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE ACHE REALIZADA A 2 DIFERENTES VOLÚMENES DE HOMOGENADO DE CABEZAS DE CAUDADO (0.01 UL, GRÁFICA SUP. Y 0.05 UL, GRÁFICA INF.) EN LAPSO DE 10 MIN. NO PRESENTA PENDIENTE ALGUNA Y POR LO TANTO SE TRADUCE ESTO EN CERO ACTIVIDAD DE ACHE.

EN LAS ORDENADAS: ACTIVIDAD DE ACHE EN UNIDADES DE DENSIDAD ÓPTICA.

EN LAS ABCISAS: TIEMPO EN QUE SE LLEVÓ A CABO LA MEDICIÓN DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA.

O Y ● = DUPLICADOS.

HIDROLISIS NO
ENZIMATICA

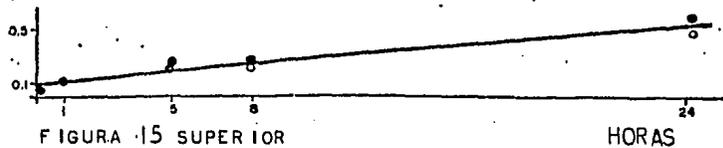


FIGURA 15 SUPERIOR

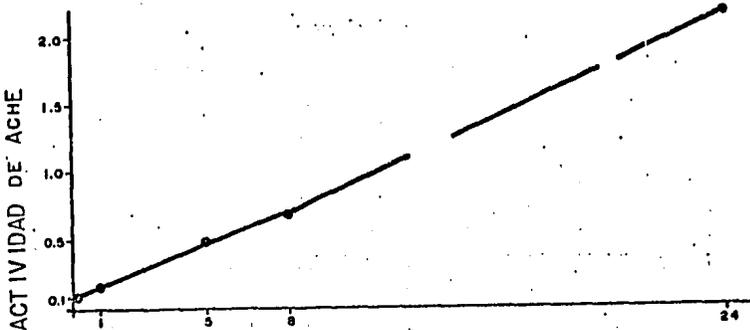


FIGURA 15 INFERIOR

HORAS

AL IGUAL QUE COMO SUCEDE CON LA DHL TAMBIÉN PARA LA AChE HABRÁ QUE CORRER UN BLANCO EN CADA ENSAJO, EL CUÁL REPRESENTARÁ LA HIDRÓLISIS NO ENZIMÁTICA DEL SUSTRATO (ACETILTIOCOLINA) (FIG. 15 SUPERIOR).

EN LA FIGURA 15 INF. SE PRESENTA UNA PENDIENTE BIEN CLARA QUE NOS HABLA DE ACTIVIDAD DE AChE PRESENTE EN PERFUSADO DE CAUDADO DE RATA, EL TIEMPO EN EL QUE SE LLEVÓ A CABO LA CINÉTICA FUE DE 24 HRS.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS ACTIVIDAD DE AChE EN UNIDADES DE DENSIDAD ÓPTICA Y, EN LAS ABCISAS EL TIEMPO EN QUE SE LLEVARON A CABO LAS MEDICIONES ENZIMÁTICAS.

FIGURA 16

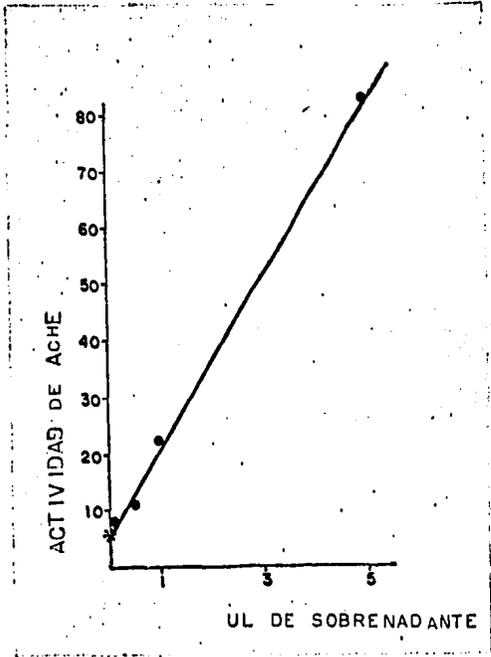
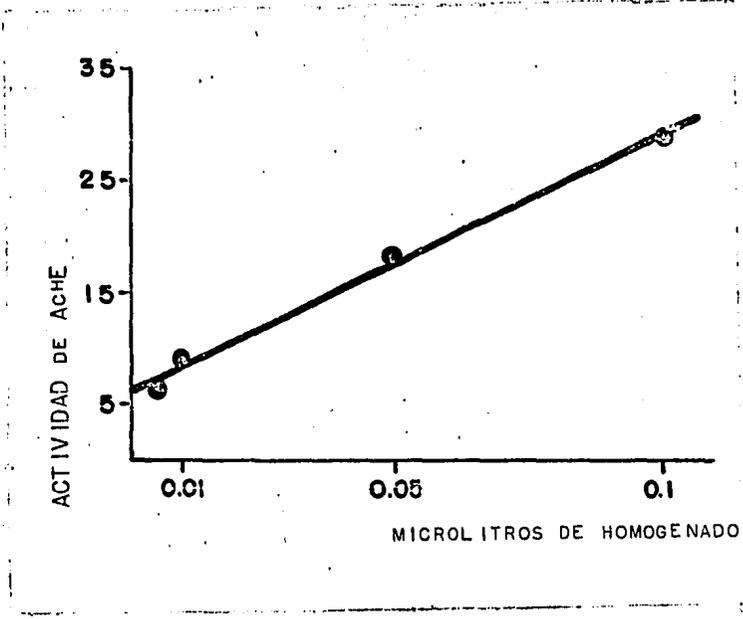
CURVAS PATRÓN DE LA ACTIVIDAD DE -
ACHE, UNA CORRESPONDIENTE A DIFEREN
TES VOLÚMENES DE SOBRENADANTE Y LA
OTRA A DIFERENTES VOLÚMENES DE HOMO
GENADO DE CAUDADO DE RATA.

EN AMBAS CURVAS LAS MEDICIONES SE
LLEVARON A CABO EN LAPROS DE 24 HRS.
ADEMÁS SE AUMENTÓ LA CANTIDAD DE EN
ZIMA APROXIMADAMENTE 12 VECES.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS UNIDADES
ABSOLUTAS DE ACTIVIDAD DE ACHE (ELL
MAN, 1961).

EN LAS ABCISAS, LOS VOLÚMENES DE
SOBRENADANTE Y HOMOGENADO EN MICRO-
LITROS.

* = VALOR DEL BLANCO



3) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.- EL ENSAYO DE PROTEÍNAS SE LLEVÓ A CABO MEDIANTE EL MÉTODO DE LOWRY & COL. (1951).

PARA LA CURVA ESTÁNDAR SE UTILIZÓ ALBÚMINA DE SUERO BOVINO (BSA), PREPARÁNDOSE SOLUCIONES (EN UG/40 UL) A DIFERENTES CONCENTRACIONES, DESDE 0.1 HASTA 51.2 .

SE ELIGIERON 5 Ó MÁS PUNTOS PARA LA CURVA ESTÁNDAR, LOS CUÁLES SE ENCONTRARON EN UN RANGO QUE FUÉ DE 5 HASTA 320 UG/ML;

4) PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE PROTEASAS SE TOMÓ COMO REFERENCIA A LOS SIGUIENTES TRABAJOS: RINDERKNECHT & COL., 1968; T.P. KING, A.C. ALAGÓN, KUAN, SOBOTKA & LICHTENSTEIN, 1983.

MEZCLA DE REACCIÓN:

BUFFER FOSFATO (PO₄) (PH 8, 0.1 M) -
900 MICROLITROS, HIDE POWDER AZURE (HPA) 2.5 MG, MUESTRA
BIOLÓGICA 100 MICROLITROS.

EN ESTE ENSAYO, UNA UNIDAD DE ACTIVIDAD ES IGUAL A LA CANTIDAD DE ENZIMA QUE HIDROLIZA UN MILIGRAMO DE SUSTRATO EN 20 HRS.

EL PROTOCOLO PARA MONTAR LA TÉCNICA Y DETERMINAR ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN PERFUSADOS DE CEREBRO FUE EL SIGUIENTE:

- 1) OBTENER UNA CURVA DE CALIBRACIÓN
- 2) OBTENER EL PH ÓPTIMO DEL ENSAYO
- 3) OBTENER EL TIEMPO ÓPTIMO PARA LEER LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

PARA LLEVAR A CABO EL INCISO 1) SE UTILIZÓ COMO SUSTRATO EL HPA, BUFFER PO₄ Y TRIPSINA (5MG/ML EN HCL 1MM). LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRIPSINA QUE SE UTILIZARON, FUERON: 0.25, 0.5 Y 1.0 MICROGRAMOS POR 100 MICROLITROS - (FIG. 17).

EN LO QUE RESPECTA AL INCISO 2) SE LLEVARON A CABO DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CONTENIDA EN MUESTRA BIOLÓGICA, HOMOGENADO Y SOBRENADANTE DE GP (LOS VOLÚMENES

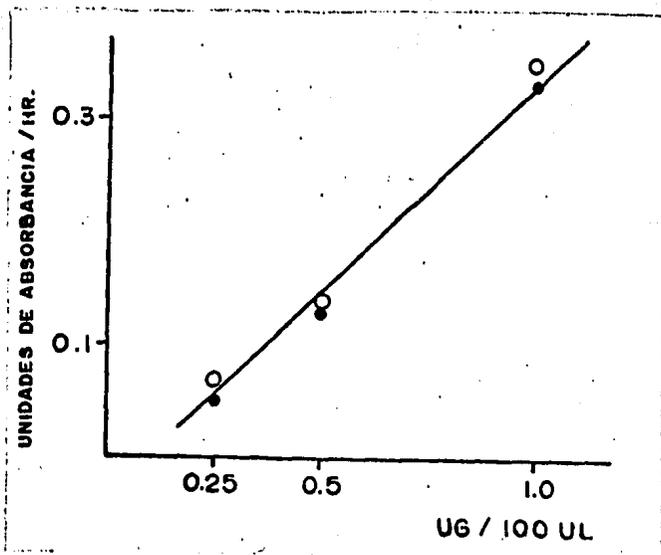


FIGURA 17.- CURVA DE CALIBRACIÓN LLEVADA A CABO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRIPSINA Y UTILIZANDO COMO SUSTRATO EL HPA . LAS CONCENTRACIONES DE TRIPSINA UTILIZADAS FUERON BASTANTE PEQUEÑAS, TOMANDO EN CUENTA LAS MUY PROBABLEMENTE BAJAS CONCENTRACIONES DE PEPTIDASAS PRESENTES EN LOS PERFUSADOS.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS UNIDADES DE ABSORBANCIA POR HORA Y, EN LAS ABCISAS MICROGRAMOS DE TRIPSINA POR 100 MICROLITROS DE BUFFER FOSFATO.

O Y ● = DUPLICADOS

TANTO DEL HOMOGENADO COMO DEL SOBRENADANTE FUERON: 0.01 - 0.1 Y 1 MICROLITRO).

LOS VALORES DE PH (UTILIZANDO BUFFER P04) SELECCIONADOS - FUERON DE: 5, DEBIDO A REFERENCIAS ANTERIORES (LOH, Y.P. & GRITSH, H.A., 1981; LOH, Y.P. & CHANG T-L., 1982) Y, DE 8 DEBIDO A QUE ES EL EXTREMO ALCALINO Y ADEMÁS POR EXPERIENCIA PROPIA DE QUE LA ACTIVIDAD DE OTRA ENZIMA EN EL CEREBRO (ACHE) SE DETECTA A ESTE PH. LOS TIEMPOS DE LECTURA FUERON A LAS 3, 7 Y 25 HRS. LUEGO DE INICIADA LA REACCIÓN. AL LLEVAR A CABO LOS ENSAYOS SE DETECTÓ ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CON EL BUFFER P04 PH 8, NO SUCEDIENDO ASÍ CON EL BUFFER P04 PH 5; POR LO QUE EN ENSAYOS POSTERIORES SE UTILIZÓ EL PRIMERO.

UNA VEZ QUE SE HUBO OBTENIDO EL PH MÁS INDICADO SE LLEVÓ A CABO EL ENSAYO ENZIMÁTICO EN EL HOMOGENADO Y SOBRENADANTE, PERO ESTA VEZ CON VOLÚMENES MAYORES: 0.5, 1.0 Y 5.0 MICROLITROS PARA EL SOBRENADANTE Y; 0.1, 0.5 Y 1.0 MICROLITROS PARA EL HOMOGENADO. LOS TIEMPOS DE LECTURA DESPUÉS DE INICIADA LA REACCIÓN FUERON: 2, 4, 6, 8 Y 24 HRS. (FIG. 18).

EN LO QUE A DETERMINACIÓN DE PROTEASAS EN PERFUSADO CERE-BRAL SE REFIERE, SE HUBO DE AUMENTAR EL VOLUMEN DE LA FUENTE BIOLÓGICA DE LA ENZIMA A 200 MICROLITROS (INICIALMENTE FUÉ DE 100 MICROLITROS) CON EL FIN DE PODER OBSERVAR ACTIVIDAD DE PROTEASAS (AÚN ASÍ DESAFORTUNADAMENTE EL RUIDO BASAL FUÉ MUY GRANDE POR LO QUE EL ENSAYO ESTÁ POR OPTIMIZARSE).

UNIDADES DE ABSORBANCIA/HR.

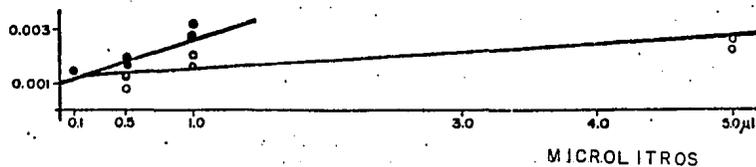


FIGURA 18.- ACTIVIDAD DE PROTEASAS, SE UTILIZÓ HPA COMO SUSTRATO Y COMO FUENTE DE ENZIMA SOBRENADANTE Y HOMOGENADO DE GP DE RATA (VOLÚMENES DEL SOBRENADANTE = 0.5, 1.0 Y 5 MICROLITROS. VOLÚMENES DEL HOMOGENADO = 0.1, 0.5 Y 1.0 MICROLITROS). EN MEDICIONES POR DUPLICADO, COMO SE OBSERVA SE OBTUVO UNA RESPUESTA LINEAL.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS UNIDADES DE ABSORBANCIA/HR. Y EN LAS ABSCISAS LOS VOLÚMENES DEL SOBRENADANTE Y EL HOMOGENADO (A CADA VOLUMEN CORRESPONDE UNA CIERTA CONCENTRACIÓN DE TEJIDO).

O.- SOBRENADANTE

●.- HOMOGENADO

C) EVALUACIÓN DE ALGUNOS MARCADORES FÍSICOS DE LESIÓN TISSULAR DURANTE UNA PERFUSIÓN IN VIVO Y, SU RELACIÓN CON LA LIBERACIÓN DE GABA EXÓGENO.

SE ANALIZARON LOS RESULTADOS DE LAS PERFUSIONES OBTENIDAS DE 20 RATAS HEMBRA (CUYO PESO SE ENCONTRABA EN UN RANGO DE 150 A 200 G.), IMPLANTADAS CON CÁNULAS GUÍA EN EL GP DER. (A= -0.84, L= +2.5, V= -2.5). DESPUÉS DE UN POSOPERATORIO DE 5 DÍAS MÍNIMO, LAS RATAS FUERON PERFUNDIDAS CON LA CÁNULA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN. SE UTILIZÓ TANTO LA CÁNULA TRADICIONAL COMO LA CÁNULA RANURADA.

UN GRUPO DE RATAS (8) SE PERFUNDIÓ CON LA BOMBA DE JERINGAS Y OTRO (12) CON LA BOMBA POLISTÁLTICA, ESTO FUÉ CON EL PROPÓSITO DE COMPARAR EL FUNCIONAMIENTO DE AMBAS (VER TABLAS 1, 2 Y 3).

EL DESARROLLO DE LAS PERFUSIONES FUÉ EL SIGUIENTE: DE CADA UNO DE LOS ANIMALES SE COLECTARON 25 MUESTRAS DE 15 MIN. CADA UNA, A UN FLUJO DE PERFUSIÓN DE 25 UL/MIN. EN LA PRIMERA COLECCIÓN SOLO SE PERFUNDIÓ RINGER KREBS, EN LOS SIGUIENTES 30 MIN. QUE CORRESPONDÍAN A LAS COLECCIONES 2 Y 3, SE PERFUNDIERON 7.14 μ Ci DE ^3H -GABA (1001/UL, ACTIVIDAD ESPECÍFICA = 34.7 Ci/MILIMOL); DE ESTA MANERA ESTE AMINOÁCIDO AL SER CAPTADO POR LAS CÉLULAS DEL ÁREA PERFUNDIDA EN EL S.N.C. SERÍA SUSCEPTIBLE DE SER LIBERADO POSTERIORMENTE MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DE LAS MISMAS. LO ANTERIOR NOS PERMITIÓ MEDIR LA FUNCIONALIDAD DEL TEJIDO PERFUNDIDO AL ESTABLECER EL GRADO DE RESPUESTA DE LAS CÉLULAS MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS PICOS DE LIBERACIÓN, SOBRE UNA BASAL CONTÍNUA.

100% de respuesta positiva
 a estimulación con alto K⁺
 medida por la liberación de
 GABA H³

TABLA 1

COLECCIONES											K ⁺	K ⁺ -Ca		K ⁺	Mec											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26

rata "Q"

1) Liberación de GABA H ³																											
2) Volumen (vol. ideal 340 ± 20 ul)										295																	
3) Sangrado											+++	++	++	++													
4) Obstrucción											X																
5) Extracción de cánula											X																
6) Se apaga bomba											X																
7) Otros																											

rata "R"

COLECCIONES											K ⁺	K ⁺ -Ca		K ⁺	Mec											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1) Liberación de GABA H ³																										
2) Volumen (vol. ideal 370 ± 30 ul)																										
3) Sangrado																										
4) Obstrucción																										
5) Extracción de cánula																										
6) Se apaga bomba																										
7) Otros																										

rata "I"

COLECCIONES											K ⁺	K ⁺ -Ca		K ⁺	Mec											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1) Liberación de GABA H ³																										
2) Volumen (vol. ideal 380 ± 20 ul)																										
3) Sangrado											+++	+														
4) Obstrucción																										
5) Extracción de cánula											X															
6) Se apaga bomba											X															
7) Otros																										

rata "D"

COLECCIONES											K ⁺	K ⁺ -Ca		K ⁺	Mec											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1) Liberación de GABA H ³																										
2) Volumen (vol. ideal 350 ul)																										
3) Sangrado																										
4) Obstrucción																										
5) Extracción de cánula																										
6) Se apaga bomba																										
7) Otros																										

EN ESTA TABLA SE PUEDE OBSERVAR QUE EN LAS PERFUSIONES EXPUES
 TAS NO SE PRESENTARON PROBLEMAS HIDRODINÁMICOS DEL TIPO DE
 OBSTRUCCIÓN Ó SANGRADO; POR LO MENOS 3 COLECCIONES ANTES Y,
 POR SUPUESTO TAMPOCO EN LAS COLECCIONES EN LAS QUE SE EFEC--
 TUÓ ESTIMULACIÓN QUÍMICA. SIENDO ESTE UN REQUISITO INDISPEN--
 SABLE PARA QUE EL TEJIDO RESPONDA A LA ESTIMULACIÓN MEDIANTE
 LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR EXÓGENO.

CLAVE.- CADA NÚMERO REPRESENTA UNA COLECCIÓN DE 15 MIN. TAN--
 TO LAS ESTIMULACIONES QUÍMICAS COMO LA MECÁNICA ESTÁN SEÑALA
 DAS EN LA COLECCIÓN CORRESPONDIENTE.

LA LIBERACIÓN DE ³H-GABA SE MARCA CON UNA CRUZ (+) CUANDO ES
 POSITIVA.

EN CUANTO AL SANGRADO, LA MAYOR INTENSIDAD CORRESPONDE A 4
 CRUCES. CADA VEZ QUE SE PRESENTA UN ACCIDENTE (OBSTRUCCIÓN,
 SANGRADO ETC.) SE MARCA CON UNA "X".

SOLO SE PRESENTAN LOS VOLÚMENES DISMINUIDOS.

NOTA.- EL 75% (RATAS O, R Y T) DE LAS PERFUSIONES FUERON REA--
 LIZADAS CON LA BOMBA POLISTÁLTICA, MIENTRAS QUE EL 25% (RATA
 D) SE REALIZARON CON LA BOMBA RECIPROCANTE. EN LAS 4 PERFU--
 SIONES SE UTILIZÓ LA CÁNULA GADDUM-MYERS.

50 a 60% de respuesta positiva
a estimulación con alto potasio
medida por la liberación de GABA H³

TABLA 2

COLECCIONES	K ⁺											K ⁺					Nec										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
rata "A"																											
1) Liberación de GABA H ³												+					Neg										
2) Volumen (vol. ideal 350 ul)												340 270 340 340 340					340 340 340										
3) Sangrado	+																										
4) Obstrucción												X					X										
5) Extracción de cánula												X					X										
6) Se apega bomba												X					X										
7) Otros												PUE					L										
rata "B"																											
1) Liberación de GABA H ³												Neg					+					+					Neg
2) Volumen (vol. ideal 350 ul)												340300300															
3) Sangrado												++ ++															
4) Obstrucción												X															
5) Extracción de cánula												X															
6) Se apega bomba												X															
7) Otros																											

EN ESTA TABLA ES DE LLAMAR LA ATENCIÓN QUE EN LAS COLECCIONES QUE NO SE OBSERVÓ RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA FUERON PRECEDIDAS POR ACCIDENTES (SOBRE TODO OBSTRUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA CÁNULA) EN COLECCIONES CERCANAS, SIN EMBARGO UNA VEZ QUE SE NORMALIZÓ EL CURSO DE LA PERFUSIÓN, EN LAS COLECCIONES MÁS APARTAS DE LOS ACCIDENTES SI SE LOGRÓ OBTENER LIBERACIÓN DE GABA H³ POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA.

MISMA CLAVE QUE PARA TABLA 1 .

NOTA.- AMBAS PERFUSIONES FUERON REALIZADAS CON LA BOMBA RECIPROCANTE Y, LA CÁNULA RANU RADA.

Cero respuesta a estimulación con alto K⁺. Medida por la liberación de GABA H³

COLECCIONES TABLA 3

rata "C"	K ⁺										K ⁺ -Ca				K ⁺				Hec									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1) Liberación de GABA H ³											Neg				Neg	320	300	330		Neg								+
2) Volumen (vol. ideal 350 ul)											300300	200	320	200							300	330						+++
3) Sangrado																					+++							
4) Obstrucción											X				X	X	X					X						
5) Extracción de cánula											X				X	X	X					X						X
6) Se apaga bomba											X				X	X	X					X						
7) Otros																												

rata "M"	K ⁺										K ⁺ -Ca				K ⁺				Hec									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1) Liberación de GABA H ³											Neg				Neg					Neg								+
2) Volumen (vol. ideal 350 ul)											164190172212218	160	220		212													248
3) Sangrado															+++	++												+++
4) Obstrucción															?	X	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	++
5) Extracción de cánula											X				X												X	
6) Se apaga bomba											X				X													
7) Otros																												

rata "P"	K ⁺										K ⁺ -Ca				K ⁺				Hec									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1) Liberación de GABA H ³															Neg					Neg								+
2) Volumen (vol. ideal 350 ul)											340300340340	250			340					300	150	150	300		340			
3) Sangrado											++				++	+	+++	+++	++									
4) Obstrucción											X		?	?	X	X	X					X	X					
5) Extracción de cánula											X				X	X	X					X	X				X	
6) Se apaga bomba											X	X			X	X	X					X	X					
7) Otros																												

EN ESTA TABLA, EN LA QUE SE PRESENTAN SOLO PERFUSIONES QUE NO RESPONDIERON A LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA (MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE ³H-GABA) SE PUEDE CONSTATAR QUE HAY UN GRAN NÚMERO DE ACCIDENTES (OBSTRUCCIÓN, SANGRADO ETC.) DURANTE EL CURSO DE LA PERFUSIÓN SIENDO MÁS OBVIA SU PRESENCIA EN Ó ALREDEDOR DE LAS COLECCIONES DESTINADAS A LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA.

MISMA CLAVE QUE PARA TABLA I.

NOTA.- EL 66.6% DE LAS PERFUSIONES FUERON REALIZADAS CON LA BOMBA RECIPROCANTE (RATAS C Y F), MIENTRAS QUE EL 33.3% (RATA M) SE REALIZÓ CON LA BOMBA POLISTÁLTICA.

SE UTILIZÓ LA CÁNULA RANURADA EN LAS PERFUSIONES DE LAS RATAS C Y M. EN LA PERFUSIÓN DE LA RATA F SE USÓ LA CÁNULA GADDUM-MYERS.

LAS ESTIMULACIONES SE LLEVARON A CABO DE ACUERDO AL ESQUEMA DE COLECCIÓN DE LA FIG. 5 Y, CONSISTIERON EN PERFUNDIR EN 2 DIFERENTES OCASIONES CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ (49 MM); UNA VEZ CON RINGER QUE CONTENÍA ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ Y CARECÍA DE Ca^{2+} Y; LA ÚLTIMA ESTIMULACIÓN QUE FUE MECÁNICA Y CONSISTIÓ EN EXTRAER Y VOLVER A INTRODUCIR INMEDIATAMENTE LA CÁNULA EN EL CEREBRO DE LA RATA. ENTRE CADA ESTIMULACIÓN Y POSTERIOR AL CARGADO CON 3H -GABA SE LAVÓ LA ZONA DE PERFUSIÓN CON RINGER KREBS.

MARCADORES POSIBLES DE LESIÓN.

- OBSTRUCCIÓN DEL FLUJO-VOLUMEN DE RECUPERACIÓN. LA EVALUACIÓN DE LA HIDRODINÁMICA DEL SISTEMA SE PUEDE HACER A TRAVÉS DE ALGUNAS GRÁFICAS DE VOLÚMENES DE RECUPERACIÓN - QUE SEAN REPRESENTATIVAS DE BUENAS PERFUSIONES (CON RESPECTO A LA LIBERACIÓN DE 3H -GABA) Ó DE AQUELLAS EN LAS QUE SE HAYA PRESENTADO ALGÚN PROBLEMA DE OBSTRUCCIÓN DE LA CÁNULA Ó DESEQUILIBRIO EN EL INFLUJO-EFLUJO. ASÍ, TENEMOS LA FIG. 6 Y LA FIG. 7 QUE MUESTRAN EL PERFIL TEMPORAL DE LOS VOLÚMENES EN 2 PERFUSIONES LIBRES DE ACCIDENTES. UNA CORRESPONDIENTE A LA BOMBA DE JERINGAS (FIG. 6) Y LA OTRA A LA BOMBA POLISTÁLTICA (FIG. 7).

DE IGUAL MANERA, EN LAS GRÁFICAS 8 (SUP. E INF.) Y 9 SE PUEDEN OBSERVAR DIFERENTES PERFILES DE VOLÚMENES EN PERFUSIONES QUE PRESENTARON OBSTRUCCIÓN CON DISMINUCIÓN DEL VOLUMEN A COLECTAR Y, RECUPERACIÓN DEL MISMO UNA VEZ SUBSANADA LA CAUSA (FIG. 8, SUP. E INF.). EN LA GRÁFICA 9 SE MUESTRA LA AUSENCIA TOTAL DE RECUPERACIÓN DEL EQUILIBRIO HIDRODINÁMICO DESPUÉS DE UNA OBSTRUCCIÓN.

CABE HACER LA ACLARACIÓN DE QUE NINGUNA DE ESTAS 3 PERFU-

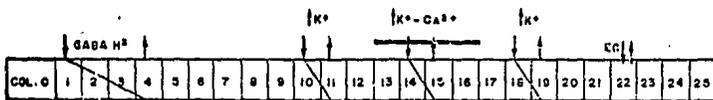


FIGURA 5

EN EL ESQUEMA SUPERIOR SE MUESTRA EL CURSO DE UNA PERFUSIÓN INICIANDO EL CARGADO DEL TEJIDO CON ^3H -GABA DURANTE 30 MIN. (COL. 2 Y 3) POSTERIORMENTE HAY UN PERIODO DE LAVADO QUE TERMINA EN LA COL. 11 DONDE SE ESTIMULA POR PRIMERA VEZ CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ . LA SEGUNDA ESTIMULACIÓN QUE SE LLEVA A CABO EN LA COL. 15 ES EFECTUADA CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ MENOS Ca^{2+} . LA TERCERA ESTIMULACIÓN CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ SE LLEVA A CABO EN LA COL. 19. Y POR ÚLTIMO LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA SE EFECTÚA EN LA COL. 22 Ó 23.

EN EL MISMO ESQUEMA SE EJEMPLIFICA (CON FLECHAS) EL MOMENTO EN QUE DEBE INICIARSE (ASÍ COMO TERMINARSE) CUALQUIERA DE LAS ESTIMULACIONES, TOMANDO EN CUENTA EL TIEMPO DE RETRASO.

EN EL ESQUEMA INF. SE MUESTRA TAMBIÉN EL CURSO DE UNA PERFUSIÓN CON LAS SIGUIENTES EXCEPCIONES: EL CARGADO DE ^3H -GABA SE REALIZA DURANTE 45 MIN. (COL. 2, 3 Y 4) Y; EN LA SEGUNDA ESTIMULACIÓN QUE TAMBIÉN SE LLEVA A CABO CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ MENOS Ca^{2+} , SE PERFUNDE RINGER KREBS MENOS Ca^{2+} MÁS Mg^{2+} DOS COLECCIONES PREVIAS A LA ESTIMULACIÓN Y UNA DESPUÉS DE LA MISMA (LA BARRA SOBRE LAS COLECCIONES 13, 14, 15 Y 16 INDICAN LO ANTES DICHO).

EC = EXTRACCIÓN DE LA CÁNULA

FIGURA 6

PERFUSIÓN A GP DER. DE RATA. CÁNULA RANURADA.
BOMBA HARVARD.

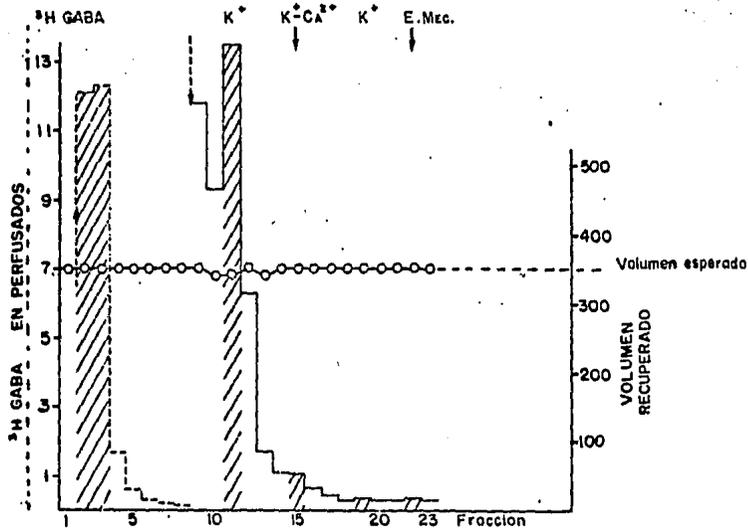
EN LAS ABCISAS, CADA NÚMERO REPRESENTA UNA COLECCIÓN DE 15 MIN. (INCLUYENDO EL CERO). EN LAS ORDENADAS ESTÁN REPRESENTADAS 2 ESCALAS, EN LA LÍNEA DISCONTÍNUA $\text{CPM} \times 10^{-5}$ Y EN LA LÍNEA CONTÍNUA $\text{CPM} \times 10^{-3}$. EN LA ORDENADA DER. SE GRAFICAN LOS VOLÚMENES COLECTADOS EN MICROLITROS POR 15 MIN.

TANTO EL CARGADO DE GABA H^3 COMO LAS ESTIMULACIONES QUÍMICAS Y LA MÉCANICA ESTÁN SEÑALADAS EN LA COLECCIÓN EN QUE SE EFECTUARON.

EL SANGRADO SE CALIFICA CON 4 CRUCES, EL MÁS INTENSO.

CUANDO SE INDICA QUE SE PARÓ LA BOMBA, EL PARÁMETRO TIEMPO SIGNIFICA LOS MINUTOS QUE SE MANTUVO SIN FUNCIONAR Y, EL PARÁMETRO EN PERFUSIÓN INDICA EL MINUTO CORRESPONDIENTE DESPUÉS DE INICIADA LA COLECCIÓN EN QUE SE PARÓ LA BOMBA.

EL PERFIL DE LOS VOLÚMENES COLECTADOS POR LA BOMBA HARVARD, TIENE COMO PROMEDIO IDEAL 350 UL OBSERVÁNDOSE UN DÉFICIT DE 10 UL SOLO EN AQUELLAS COLECCIONES CERCANAS A Ó EN EL PRECISO INSTANTE EN QUE SE DETECTÓ OBSTRUCCIÓN DE LA CÁNULA (MÁS ESPECÍFICAMENTE DE LA TUBERÍA PUSH). POR LO DEMÁS ESTE SE PUEDE CONSIDERAR UN PERFIL BASTANTE ACEPTABLE EN LO QUE A VOLÚMENES SE REFIERE.



OBSERVABLES	SANGREDO	+++	
	OBSTRUCCION	+++	PUSH
	OYROS		RLU
			RIG
OPERACION	PARAR BOMBA	/	/
	EXTRACCION CANULA	/	/
DURACION DEL OBSERVABLE Y/O TIEMPO EN QUE SE HICIA LA OPERACION	EN PERFUSION	110'	47'
	TIEMPO	3'	

FIGURA 7

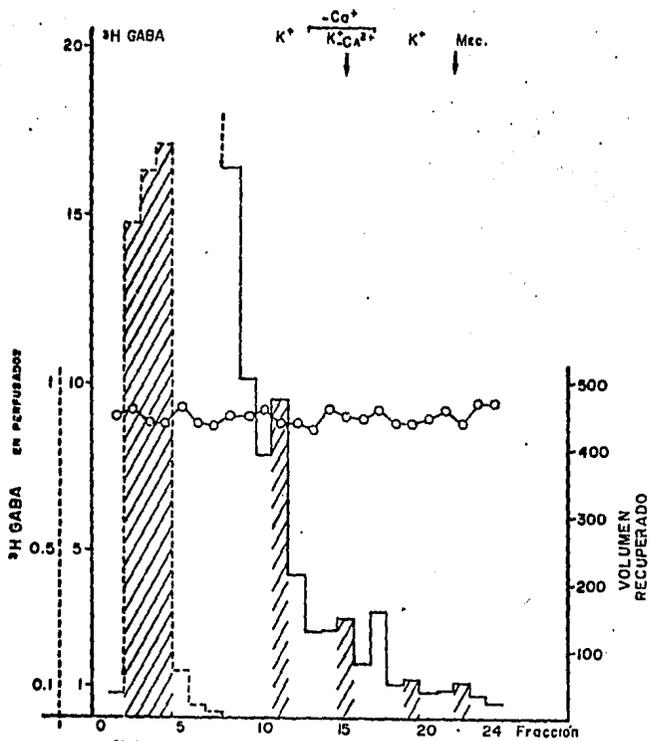
PERFUSIÓN A CAUDADO DER. DE RATA. CÁNULA RANURADA. BOMBA POLISTÁLTICA.

EL PERFIL DE VOLÚMENES PRESENTA VARIACIONES NORMALES HASTA DE 20 ± 5 MICROLITROS (PROMEDIO IDEAL DE LOS VOLÚMENES = 450 UL).

EN ESTA GRÁFICA TOMANDO COMO ÚNICO PARÁMETRO DE CALIFICACIÓN A LOS VOLÚMENES, SE PODRÍA CONCLUIR QUE ES UNA BUENA PERFUSIÓN.

EN LAS ORDENADAS ESTÁN REPRESENTADAS 2 ESCALAS, EN LA LÍNEA DISCONTÍNUA $CPM \times 10^{-6}$ Y EN LA LÍNEA CONTÍNUA $CPM \times 10^{-3}$.

LA EXPLICACIÓN DE LOS PARÁMETROS FALTANTES SE ENCUENTRA EN LA LEYENDA DE LA FIG. 6.



OBSERVABLES

OBSTRUCCION

OTROS

OPERACION

DURACION DEL OBSERVABLE Y/O TIEMPO EN QUE SE INICIA LA OPERACION

SANCRADO

OBSTRUCCION

OTROS

PARAR BOMBA

EXTRACCION CANULA

EN PERFUSION

TIEMPO

DEPUES

DE LA LUZ

1966

SINCRONIZAS

FIGURA 8

GRÁFICA SUPERIOR, PERFUSIÓN GP DER. CÁNULA RANURADA. BOMBA HARVARD.

GRÁFICA INFERIOR, PERFUSIÓN GP DER. CÁNULA RANURADA. BOMBA HARVARD.

EN ESTAS 2 PERFUSIONES REALIZADAS CON LA BOMBA HARVARD, HAY PROBLEMAS HIDRODINÁMICOS OBVIOS. REVISANDO EL PERFIL DE VOLÚMENES ES CLARO QUE HAY UNA DISMINUCIÓN DE LOS MISMOS EN EL PUNTO EXACTO DEL PROBLEMA HIDRODINÁMICO (OBSTRUCCIÓN Vg.) Y ADEMÁS EN LAS COLECCIONES VECINAS, SIENDO MÁS MARCADA LA DISMINUCIÓN EN EL PRIMERO. TAMBIÉN ES DE HACERSE NOTAR LA RECUPERACIÓN COMPLETA DEL PERFIL UNA VEZ SUBSANADA LA CAUSA.

EN LAS ORDENADAS ESTÁN REPRESENTADAS 2 ESCALAS, EN LA LÍNEA DISCONTÍNUA $\text{CPM} \times 10^{-4}$ Y EN LA LÍNEA CONTÍNUA $\text{CPM} \times 10^{-3}$ (GRÁFICA SUP.). EN LA GRÁFICA INF., LAS ESCALAS SON: LÍNEA DISCONTÍNUA $\text{CPM} \times 10^{-5}$ LÍNEA CONTÍNUA $\text{CPM} \times 10^{-3}$.

LA EXPLICACIÓN DE LOS PARÁMETROS FALTANTES SE ENCUENTRAN EN LA LEYENDA DE LA FIG. 6.

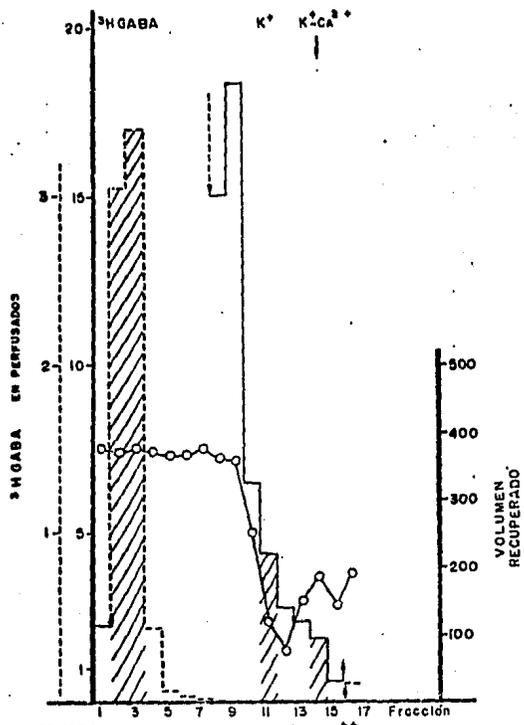
FIGURA 9

PERFUSIÓN CAUDADO DER. CÁNULA GADDUM. BOMBA PO
LISTÁLTICA.

ESTA GRÁFICA NOS MUESTRA EL FENÓMENO CLÁSICO -
DE UNA PERFUSIÓN QUE AL PRINCIPIO LLEVA UN BUEN
RITMO (CALIFICADO AL TOMAR EN CUENTA SOLO EL -
PERFIL DE LOS VOLÚMENES COLECTADOS), PERO UNA -
VEZ QUE SE PRESENTAN PROBLEMAS (DE OBSTRUCCIÓN
SOBRE TODO) LA PERFUSIÓN SE VA PARA ABAJO (OB-
SERVAR EL PERFIL DE LOS VOLÚMENES) NO VOLVIEN-
DOSE A RECUPERAR EL CURSO NORMAL.

EN LAS ORDENADAS ESTÁN REPRESENTADAS 2 ESCALAS
EN LA LÍNEA DISCONTÍNUA CPM x 10^{-6} Y EN LA LÍ-
NEA CONTÍNUA CPM x 10^{-3} .

LA EXPLICACIÓN DE LOS PARÁMETROS FALTANTES SE
ENCUENTRA EN LA LEYENDA DE LA FIG. 6 .



	(SANGRADO ↔↔↔)	↔↔	↔↔
OBSERVABLES	OBSTRUCCION	+	+
	OTROS	PUSH	PUSH
OPERACION	PARAR BOMBA		
	EXTRACCION CANULA	✓	✓
	EN PERFUSION		
DURACION DEL OBSERVABLE Y/O TIEMPO EN QUE SE INICIA LA OPERACION	TIEMPO	6'	3'

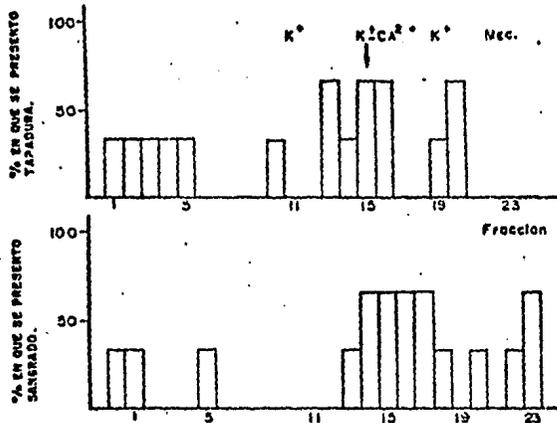
SIONES (8 SUP. E INF. Y 9) TUVO RESPUESTA POSITIVA A LA -
LIBERACIÓN DE ^3H -GABA POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA, YA QUE -
LOS DÉFICITS DE VOLUMEN SE PRESENTARON CERCANOS A, Ó EN -
LA PRIMERA ESTIMULACIÓN (COLECCIÓN 11).

- SANGRADO Y OBSTRUCCIÓN. ESTOS PARÁMETROS SE PUEDEN UTI-
LIZAR PARA CALIFICAR UNA SESIÓN DE PERFUSIÓN (CON RESPEC-
TO A LA LIBERACIÓN DE ^3H -GABA). COMO SE PUEDE OBSERVAR EN
LA FIG. 10, EN LAS PERFUSIONES NO EXITOSAS EL PORCENTAJE
DE SANGRADOS Y OBSTRUCCIONES ES ALTO SOBRE TODO EN LAS CO-
LECCIONES DESTINADAS A ESTIMULACIÓN QUÍMICA. EN CAMBIO EN
LAS PERFUSIONES EXITOSAS EL MAYOR PORCENTAJE DE SANGRADOS
SE ENCUENTRA AL INICIO DE LAS MISMAS (CUANDO SE INTRODUCE
LA CÁNULA) Y EN LAS COLECCIONES CORRESPONDIENTES A LA ES-
TIMULACIÓN MECÁNICA. EN CUANTO AL PORCENTAJE DE OBSTRUC-
CIONES REALMENTE ES BAJO Y AL PARECER FUERON MÍNIMAS YA -
QUE NO AFECTARON LA RESPUESTA DEL TEJIDO A ESTIMULACIÓN -
QUÍMICA.

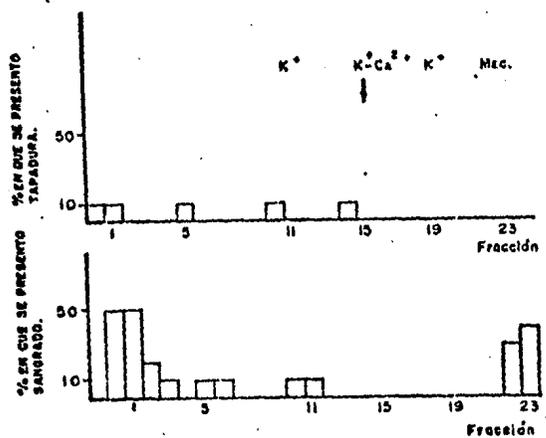
FIGURA 10

EN ESTAS GRÁFICAS SE MUESTRAN 2 PARÁMETROS DE COMPARACIÓN (SANGRADOS Y OBSTRUCCIONES) PRESENTES EN 2 TIPOS DE PERFUSIONES: GRÁFICA SUPERIOR, EN LAS QUE NO SE OBTUVO LIBERACIÓN DE ^3H -GABA POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA (PERFUSIONES NO EXITOSAS) Y GRÁFICA INFERIOR, EN LAS QUE SE OBTUVO EL --- 100% DE RESPUESTA A ESTIMULACIÓN QUÍMICA, REPRESENTADA POR LA LIBERACIÓN DE ^3H -GABA POR EL TEJIDO (PERFUSIONES EXITOSAS).

Liberación de GABA H³ en el 0% de las estimulaciones químicas. (3 ratas)



Liberación de GABA H³ en el 100% de las estimulaciones químicas. (10 ratas)



D) VALIDACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS COMO MARCADORES DE LESIÓN TISULAR Y COMO MARCADORES DE VIABILIDAD CELULAR EN UNA PERFUSIÓN.

CON EL FIN DE REUNIR MAS DATOS QUE DEMOSTRARAN LA LIBERACIÓN DE DIFERENTES MACROMOLÉCULAS TALES COMO ACHÉ, PROTEÍNAS, PROTEASAS ADEMÁS DE GABA Y DHL POR LESIÓN TISULAR Y POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA, SE DECIDIÓ LLEVAR A CABO PERFUSIONES EN 2 ÁREAS DEL S.N.C.: GLOBO PÁLIDO Y NÚCLEO CAUDADO (DE ACUERDO CON LAS RAZONES YA EXPUESTAS ANTERIORMENTE). PARA LLEVAR A CABO LO ANTERIOR, SE IMPLANTARON ESTEREOTÁXICAMENTE CON GUÍAS PARA CÁNULA 8 RATAS HEMBRA CON UN RANGO DE PESO DE 150 A 200 GRs.

CUATRO RATAS SE IMPLANTARON EN EL NC (A= +0.30, L= +2.5 - V= -2.5) Y CUATRO EN EL GP (A= -0.84, L= +2.5, V= -2.5).

DESPUÉS DE UN POS-OPERATORIO MÍNIMO DE 5 DÍAS, LAS RATAS FUERON PERFUNDIDAS CON LA CÁNULA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN DE ACUERDO CON LOS SIGUIENTES PARÁMETROS:

- SE UTILIZÓ LA CÁNULA TRADICIONAL
- TODAS LAS RATAS SE PERFUNDIERON CON LA BOMBA POLISTÁLTICA .

- EL DESARROLLO DE LAS PERFUSIONES FUÉ EL SIGUIENTE:

EN CADA UNO DE LOS ANIMALES SE COLECTARON DE 23 A 25 MUESTRAS DE 15 MIN. C/U, A UNA VELOCIDAD PROMEDIO DE 33 MICROLITROS POR MIN. (LA PERFUSIÓN DURÓ EN TOTAL 6 HRS).

EN LA PRIMERA COLECCIÓN SOLO SE PERFUNDIÓ RINGER KREBS, - LOS SIGUIENTES 45 MIN. QUE CORRESPONDIERON A LAS COLECCIONES 2, 3 Y 4 SE PERFUNDIÓ ^3H -GABA . ESTA VEZ SE PERFUNDIÓ DURANTE MÁS TIEMPO EL GABA MARCADO DEBIDO A QUE LA VELOCI-

DAD DE PERFUSIÓN FUÉ MAYOR.

DURANTE LA PERFUSIÓN SE LLEVARON A CABO 3 ESTIMULACIONES - QUÍMICAS CON K^+ 49 MM. LA PRIMERA, EN LA COLECCIÓN NO. 11, LA SEGUNDA FUÉ REALIZADA EN LA COLECCIÓN NO. 15 CON LA PECULIARIDAD DE QUE 2 COLECCIONES ANTES DE LA MISMA Y UNA - DESPUÉS, SE PERFUNDIÓ RINGER KREBS SIN Ca^{2+} . EL RINGER CON K^+ 49 MM TAMBIÉN ESTABA EXENTO DE Ca^{2+} . LA TERCERA ESTIMULACIÓN FUÉ LLEVADA A CABO EN LA COLECCIÓN NO. 19; POR ÚLTIMO SE REALIZÓ UNA LESIÓN MECÁNICA QUE CONSISTIÓ EN EXTRAER Y VOLVER A INTRODUCIR LA CÁNULA EN EL SITIO DE PERFUSIÓN, ESTO SE LLEVÓ A CABO YA SEA EN LA COLECCIÓN 22 Ó 23 (FIG. 5).

LIBERACIÓN POR ESTIMULACIÓN. - ES AQUELLA EN LA CUÁL SE PROVOCA LA SALIDA DE UNA DETERMINADA MOLÉCULA BIOLÓGICA DE LA (S) CÉLULA (S). POR EJ. MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN CON UNA SUSTANCIA QUÍMICA DEPOLARIZANTE (EN ESTE CASO, COMO YA SE HA MENCIONADO SE UTILIZÓ K^+ 49 MM). LA MOLÉCULA PUEDE SER UN NEUROTRANSMISOR Ó UNA PROTEÍNA (ENZIMÁTICA Ó NO).

- 3H -GABA. EN ESTE TRABAJO SE UTILIZÓ (ENTRE OTRAS MOLÉCULAS) AL NEUROTRANSMISOR, ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO (GABA) COMO PARÁMETRO DE VIABILIDAD CELULAR. ASÍ PODEMOS OBSERVAR EN LA FIG. 19 LA LIBERACIÓN DE 3H -GABA PROVOCADA POR ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ EN EL MEDIO DE PERFUSIÓN. EN LAS 3 - ESTIMULACIONES QUÍMICAS MARCADAS EN LA FIG. 19, SE OBSERVA UNA LIBERACIÓN DE 3H -GABA, SOLO QUE LA CANTIDAD LIBERADA - FUÉ DECRECIENDO (HECHO QUE SE TRATARÁ DE EXPLICAR EN EL APARTADO DE LA DISCUSIÓN). SE INCLUYE ADEMÁS UN GRÁFICA POR MEDIO DE 8 PERFUSIONES (FIG. 20) EN LAS QUE SE OBTUVO RES-

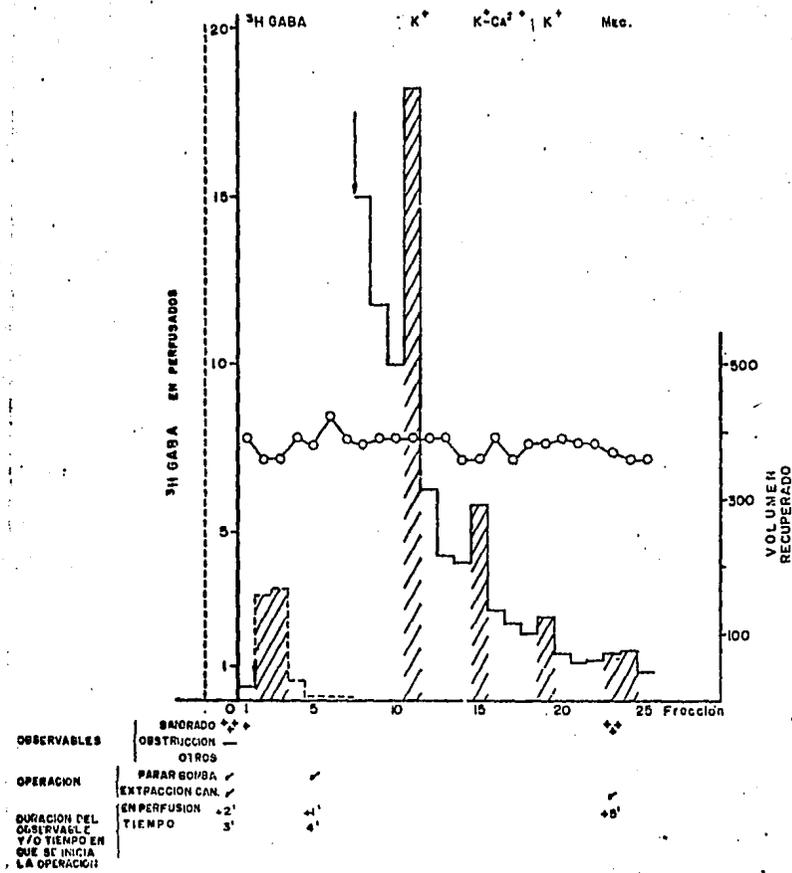


FIGURA 19

PERFIL DE LIBERACIÓN DE ³H-GABA CORRESPONDIENTE A UNA PERFUSIÓN SIN ACCIDENTES (REALIZADA EN GP DE RATA).

PARA CLAVE VER PIE DE FIGURA 6 .

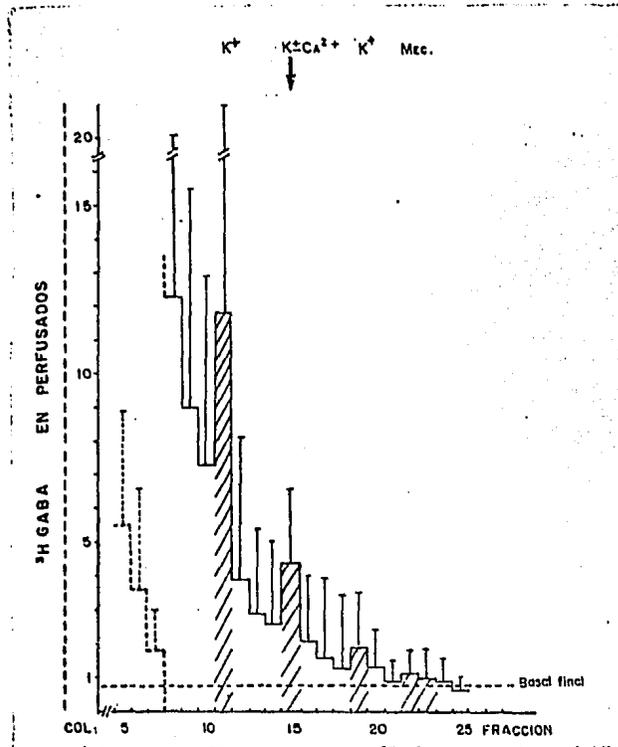


FIGURA 20

PROMEDIO DE LIBERACIÓN DE ^3H -GABA DE 8 PERFUSIONES SIN ACCIDENTES (REALIZADAS EN GP DE RATA). EN LAS ORDENADA TENEMOS 2 ESCALAS, LÍNEA PUNTEADA; $\text{CPM} \times 10^{-4}$. LÍNEA CONTÍNUA, $\text{CPM} \times 10^{-3}$. LA LÍNEA VERTICAL SOBRE LA BARRA CORRESPONDE A LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. CADA ESTIMULACIÓN YA SEA QUÍMICA Ó MECÁNICA SE ENCUENTRA SEÑALADA EN LA COLECCIÓN CORRESPONDIENTE.

PUESTA POSITIVA EN LAS 3 ESTIMULACIONES Y UNA GRÁFICA INDIVIDUAL QUE MUESTRA EL PERFIL DE LIBERACIÓN DE ^3H -GABA CORRESPONDIENTE A UNA MALA PERFUSIÓN (FIG. 8 INF.).

- PROTEÍNAS. EN LA FIG. 22 SE PUEDE OBSERVAR EL PERFIL DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS (EN GP DE RATA), CORRESPONDIENTE AL PROMEDIO DE 8 PERFUSIONES LIBRES DE ACCIDENTES. ES DE HACERSE NOTAR QUE AL INICIO DE LA PERFUSIÓN (CON LA INSERCIÓN DE LA CÁNULA) ASÍ COMO AL FINAL DE LA MISMA (EN LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA) LOS NIVELES DE LIBERACIÓN PROTEICA SON BASTANTE MAYORES QUE LOS QUE SE LOGRA OBTENER CON UNA ESTIMULACIÓN QUÍMICA. SE MUESTRA ADEMÁS EL PERFIL DE LIBERACIÓN PROTEICA DE 4 PERFUSIONES LIMPIAS (EN NC DE RATA) - FIG. 23.

LO ANTERIOR NOS INDICA QUE LA PROTEÍNA PUEDE UTILIZARSE TAMBIÉN COMO MARCADOR DE LESIÓN CELULAR, ASÍ EN LA GRÁFICA 21 SE PUEDEN OBSERVAR GRANDES PICOS DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNA CUANDO SE PRESENTAN ACCIDENTES EN LA PERFUSIÓN DEL TIPO DE APAGADO DE LA BOMBA (DEBIDO A FALLA ELÉCTRICA), Ó MOVIMIENTO BRUSCO DEL ANIMAL.

- ACETILCOLINESTERASA. LA FIG. 24 MUESTRA EL PERFIL DE LIBERACIÓN DE AChE DE UN PROMEDIO DE 4 PERFUSIONES EXITOSAS EN NC DE RATA.

AL IGUAL QUE CON LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS, SE OBTIENEN PICOS ALTOS DE "LIBERACIÓN" AL INICIO Y AL FINAL DE LA PERFUSIÓN; COINCIDIENDO PERFECTAMENTE CON EL TRAUMA FÍSICO DE LA INSERCIÓN Y/Ó EXTRACCIÓN DE LA CÁNULA. PUEDE OBSERVARSE TAMBIÉN UNA LÍNEA BASAL DE LIBERACIÓN Y, EN LAS COLECCIONES DONDE SE LLEVÓ A CABO LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA UNOS PICOS (AUNQUE PEQUEÑOS) DE LIBERACIÓN DE LA ENZIMA.

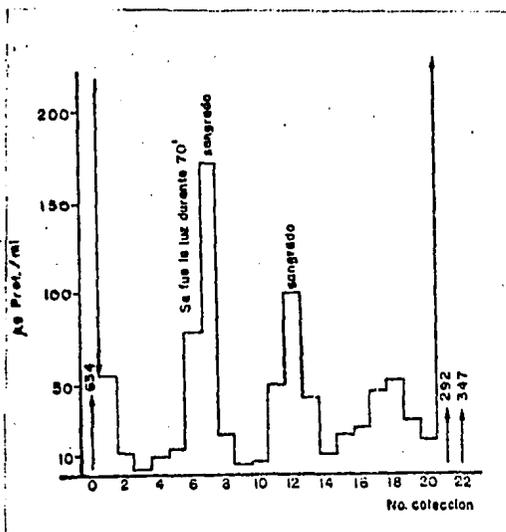


FIGURA 21

EN ESTA PERFUSIÓN LLEVADA A CABO EN NC DE RATA; LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS NOS DA UN PERFIL CARACTERÍSTICO DE LESIONES AL TEJIDO, PRODUCIDAS POR ACCIDENTES DURANTE LA PERFUSIÓN.

COMO YA SE HA DESCRITO ANTERIORMENTE EXISTE GRAN LIBERACIÓN DE PROTEÍNA AL INICIO (CON LA INTRODUCCIÓN DE LA CÁNULA) Y AL FINAL (CON LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA); EN ESTA GRÁFICA SE PRESENTAN ADEMÁS OTROS 2 PICOS UNO EN LA COL. 7 Y OTRO EN LA COL. 12. EL PRIMERO VA PRECEDIDO DE UNA FALLA ELÉCTRICA (POR LO TANTO SE PARÓ LA BOMBA DE PERFUSIÓN) Y, EL SEGUNDO PICO ES PRODUCTO DE UN SANGRADO.

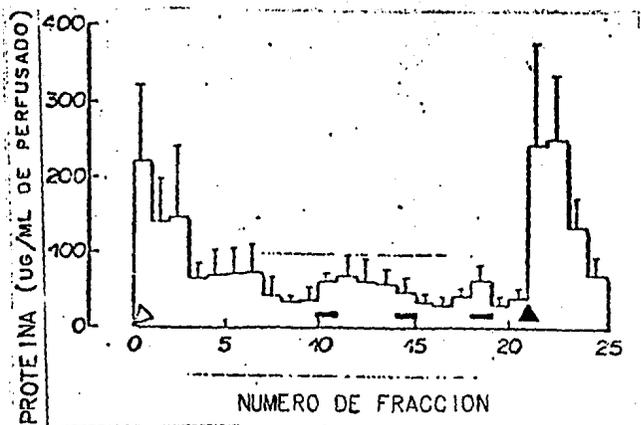


FIGURA 22.

ESTA GRÁFICA PRESENTA EL PROMEDIO DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS EN 8 PERFUSIONES SIN ARTEFACTOS, REALIZADAS EN GP DE RATA. LOS PICOS MÁS ALTOS DE LIBERACIÓN QUE SE OBTIENEN AL PRINCIPIO Y AL FINAL DE LAS PERFUSIONES CORRESPONDEN AL TRAUMATISMO QUE PROVOCA LA INSERCIÓN Y/O EXTRACCIÓN DE LA CÁNULA. PERO ADEMÁS SE OBSERVAN UNOS PEQUEÑOS PICOS DE LIBERACIÓN, CORRESPONDIENTES A LAS ESTIMULACIONES QUÍMICAS (SEÑALADAS POR LAS BARRAS PARALELAS A LAS ABCISAS). LAS LÍNEAS VERTICALES SOBRE LAS BARRAS REPRESENTA EL SEM .

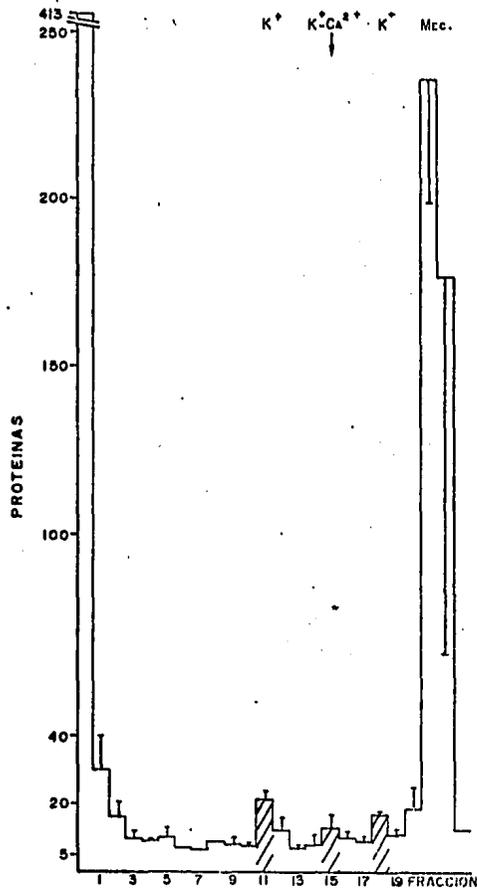
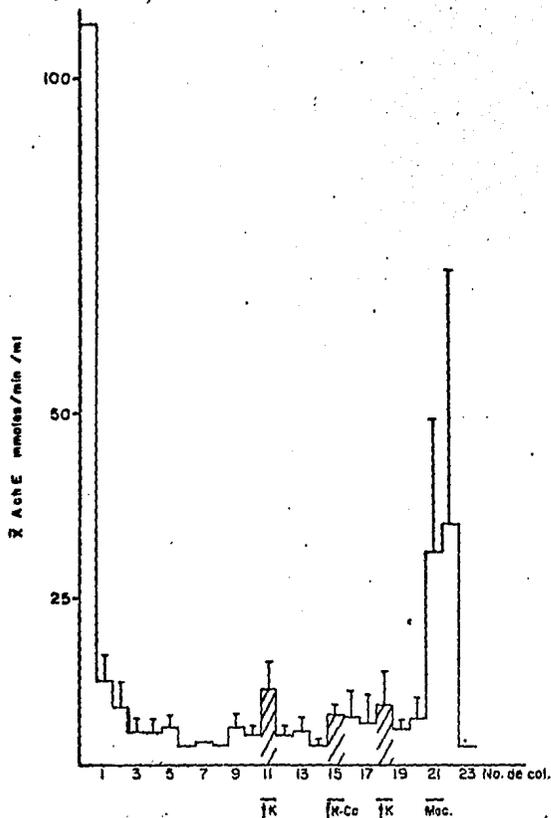


FIGURA 23

AQUÍ SE MUESTRA LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS DE UN PROMEDIO SE 4 PERFUSIONES REALIZADAS EN EL NC DE RATA. EN LAS ORDENADAS TENEMOS UG DE -- PROTEÍNA/ML DE PERFUSADO Y EN LAS ABSCISAS CADA NÚMERO REPRESENTA UNA COLECCIÓN DE 15 MIN. TANTO LAS ESTIMULACIONES QUÍMICAS COMO LA MECÁNICA SE ENCUENTRAN SEÑALADAS EN LA COLECCIÓN CORRESPONDIENTE.

LAS LÍNEAS SOBRE LAS BARRAS REPRESENTAN EL -- SEM.



NOTA: LAS LINEAS SOBRE LAS BARRAS REPRESENTAN EL SEN
 LAS BARRAS QUE NO PRESENTA SEN SE DEBE A QUC N°2

FIGURA 24

ESTA GRÁFICA MUESTRA EL PERFIL DE LIBERACIÓN DE AChE DE 4 PERFUSIONES LIBRES DE ACCIDENTES, REALIZADAS EN NC DE RATA.

EN LAS ORDENADAS: MMOLES/MIN./ML DE AChE. EN LAS ABCISAS CADA NÚMERO REPRESENTA UNA COLECCIÓN DE 15 MIN. EL CARGADO DE ³H-GABA -- ASÍ COMO LAS ESTIMULACIONES QUÍMICAS Y LA ME CÁNICA SE ENCUENTRAN SEÑALADAS EN LA COLECCIÓN CORRESPONDIENTE.

LIBERACIÓN POR LESIÓN. - ALGUNAS MOLÉCULAS Y/O ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS (VG. DHL) SOLO PUEDEN SER MEDIDAS EN PLASMA O LÍQUIDO INTERCELULAR CUANDO LA(S) CÉLULA(S) ES LESIONADA. DE ESTA MANERA, EL CONCEPTO DE LIBERACIÓN POR LESIÓN, SE REFIERE EXCLUSIVAMENTE A LAS MOLÉCULAS MEDIBLES DESPUÉS DE LESIÓN CELULAR Y NO AL ESTIMULAR "FISIOLÓGICAMENTE" UNA POBLACIÓN CELULAR.

- DESHIDROGENASA LACTICA. LOS PERFILES DE DHL OBTENIDOS EN ESTAS PERFUSIONES, INDICAN QUE EXISTE DESTRUCCIÓN CELULAR Y GRAN LIBERACIÓN DE LA DHL AL INSERTAR LA CÁNULA, AL INICIO DE LA PERFUSIÓN Y CUANDO SE LLEVA A CABO LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA EN LAS ÚLTIMAS COLECCIONES, 22 O 23 (EXTRACCIÓN E INSERCIÓN DE LA CÁNULA). SIN EMBARGO, EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE AMBOS TRAUMATISMOS SE OBSERVA UNA "LIBERACIÓN" BAJA, QUE SE PUEDE CONSIDERAR BASAL DE LA DHL. EL PLASMA EXTRAVASADO A LA REGIÓN PERFUNDA CONTIENE DHL, LO CUÁL ES FUERTEMENTE INDICATIVO DE QUE NO EXISTE DESTRUCCIÓN CELULAR IMPORTANTE A TRAVÉS DE TODO EL TIEMPO QUE DURA LA PERFUSIÓN.

PARA HACER MÁS OBJETIVO LO ANTERIORMENTE EXPUESTO CON RESPECTO AL PERFIL DE LA DHL COMO PARÁMETRO DE DESTRUCCIÓN CELULAR Y A SU VEZ DEMOSTRAR LA PRESENCIA DE TEJIDO VIABLE, EN CUANTO A QUE PUEDA RESPONDER A ESTIMULACIÓN QUÍMICA MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE ALGUNA SUBSTANCIA, SE INCLUYE UNA GRÁFICA PROMEDIO Y UNA INDIVIDUAL (FIG. 25, 26) DE DHL, CORRESPONDIENTE A PERFUSIONES EN LAS QUE SE OBTUVO EL 100% DE RESPUESTA DEL TEJIDO A ESTIMULACIÓN CON K^+ 49 MM, MEDIDA POR LA LIBERACIÓN DE 3H - GABA.

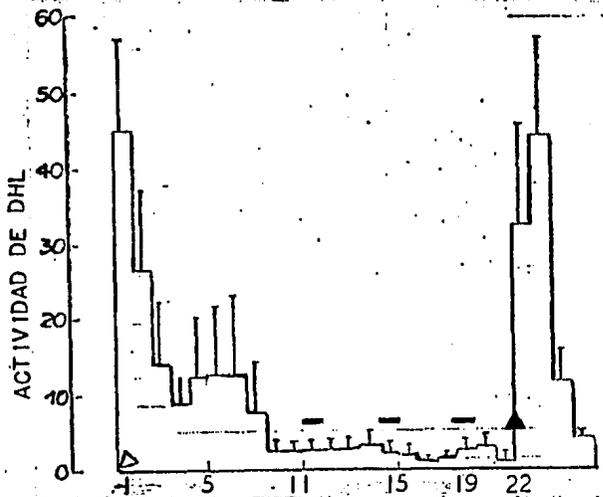


FIGURA 25

PROMEDIO DE 8 PERFUSIONES A LAS CUÁLES SE LES DETERMINÓ LA ACTIVIDAD DE DHL Y, COMO SE PUEDE OBSERVAR PRÁCTICAMENTE SOLO EXISTE GRAN ACTIVIDAD AL INICIO DE LA PERFUSIÓN (CUANDO SE INSERTA LA CÁNULA) Y AL FINAL DE LA MISMA (EN LAS COLECCIONES CORRESPONDIENTES A LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA), OBTENIENDOSE UNA LÍNEA BASAL EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE AMBOS SUCESOS.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS LA ACTIVIDAD DE DHL EN UNIDADES/ML DE PERFUSADO Y EN LAS ABCISAS CADA NÚMERO CORRESPONDE A UNA COLECCIÓN DE 15 MIN.

LAS BARRAS NEGRAS PARALELAS A LAS ABCISAS INDICAN EL MOMENTO DE LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA. LAS LÍNEAS SOBRE LAS BARRAS = SEM.

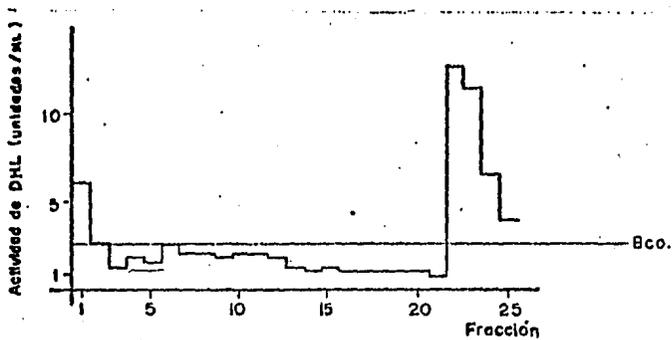


FIGURA 26

ESTA GRÁFICA MUESTRA EL PERFIL DE ACTIVIDAD DE DHL EN UNA PERFUSIÓN SIN ACCIDENTES. SE OBSERVA LA TENDENCIA A PRESENTAR GRAN ACTIVIDAD DE DHL SOLO EN LAS COLECCIONES EN LAS QUE SE INFRINGIÓ ALGÚN DAÑO AL TEJIDO, YA SEA AL INSERTAR LA CÁNULA Ó AL LLEVAR A CABO LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS ACTIVIDAD DE DHL EN UNIDADES INTERNACIONALES $\times 10^{-4}$ Y, EN LAS -- ABSCISAS CADA NÚMERO REPRESENTA UNA COLECCIÓN DE 15 MIN.

- PROTEASAS.- LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN TEJIDO NERVIOSO SE ASOCIA MAYORMENTE CON LOS LISOSOMAS. SIN EMBARGO NO DEBE DESCARTARSE QUE EL AUMENTO DE ESTA ACTIVIDAD EN PERFUSADOS PUDIERA DARSE TAMBIÉN DESPUÉS DE ESTIMULAR FISIOLÓGICAMENTE AL TEJIDO, SI PROVINIESEN DE OTROS ORGANELOS COMO LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS.

COMO SE OBSERVARÁ EN LA FIG. 27 HAY 2 PICOS EVIDENTES UNO AL INICIO Y OTRO AL FINAL DE LA PERFUSIÓN, LOS CUÁLES CORRESPONDEN A LA INSERCIÓN DE LA CÁNULA Y A LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA (EXTRACCIÓN-REINSERCIÓN DE LA CÁNULA). AMBOS PROCESOS COMO YA SE DEMOSTRÓ PRODUCEN LESIÓN CELULAR .

SERÍA MUY AVENTURADO, DECIR QUE LOS PEQUEÑOS PICOS OBSERVADOS EN LA COLECCIÓN 15 Y LA 18 SON EL RESULTADO DE LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA; SIN EMBARGO ESTO MISMO NOS DEJA LAS PUERTAS ABIERTAS COMO PARA PENSAR EN LA POSIBILIDAD DE QUE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS PUDIERA SER MEDIDA DESPUÉS DE ESTIMULAR QUÍMICAMENTE AL TEJIDO.

POR ÚLTIMO SE PRESENTA UNA TABLA (TABLA NO. 4) EN LA QUE SE RESUME LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNA Y DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN 2 REGIONES DEL CEREBRO: NÚCLEO CAUDADO Y GLOBO PÁLIDO DE RATA.

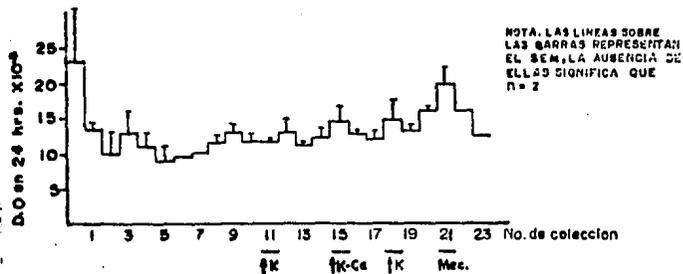


FIGURA 27

GRÁFICA QUE PRESENTA LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN UN PROMEDIO DE 4 PERFUSIONES REALIZADAS EN NÚCLEO CAUDADO DE RATA.

EN LAS ORDENADAS TENEMOS UNIDADES DE DENSIDAD ÓPTICA EN 24 HRS. POR 10^{-3} .

EN LAS ABSCISAS CADA NÚMERO REPRESENTA UNA COLECCIÓN DE 15 MIN.

LAS ESTIMULACIONES QUÍMICAS, COMO LA MECÁNICA SE ENCUENTRAN SEÑALADAS EN LA COLECCIÓN CORRESPONDIENTE.

TABLA 4

LIBERACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y PROTEINA TOTAL DE LA REGION DEL
ESTRIADO ESTIMULADA POR DEPOLARIZACION QUIMICA O POR DAÑO MECANICO.

	GLOBO PÁLIDO		CAUDO-PUTAMEN	
	LIBERACIÓN INDUCIDA POR DEPOLARIZACIÓN (% DEL CONTROL)	LIBERACIÓN INDUCIDA MECÁNICAMENTE (% DEL CONTROL)	LIBERACIÓN INDUCIDA POR DEPOLARIZACIÓN (% DEL CONTROL)	LIBERACIÓN INDUCIDA MECÁNICAMENTE (% DEL CONTROL)
DHL	105 ± 23	2010 ± 616	114 ± 16	1870 ± 720
PROTEASAS	125 ± 25	216 ± 65	108 ± 19	156 ± 18
ACHE	134 ± 14	284 ± 113	240 ± 60	660 ± 400
PROTEÍNA	250 ± 62	1700 ± 580	275 ± 24	2300 ± 600

EN ESTA TABLA SE PLANTEA LA LIBERACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y PROTEÍNA TOTAL DE LA REGIÓN DEL ESTRIADO, MEDIANTE DEPOLARIZACIÓN Ó POR DAÑO MECÁNICO. LA LIBERACIÓN FUÉ INDUCIDA POR DEPOLARIZACIÓN CON ALTO K^+ (50 MM) EN EL MEDIO DE PERFUSIÓN, Ó MECÁNICAMENTE MEDIANTE LA EXTRACCIÓN Y REINSERCIÓN DE LA CÁNULA. LOS DATOS SON EXPRESADOS COMO EL POR CIENTO MÁS MENOS EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (N=4) DE LOS VALORES DE LIBERACIÓN BASAL POR MILILITRO DE PERFUSADO.

EN EL GP ESTOS VALORES CONTROL FUERON: DHL, 6.5 ± 2.7 U; PROTEASAS, 12 ± 1 U; ACHE, 2.6 ± 0.4 U Y PROTEÍNA 30 ± 4 MICROGRAMOS.

EN EL CAUDO-PUTAMEN LOS VALORES BASALES FUERON: DHL 16 ± 4.2 U; PROTEASAS, 12.5 ± 2 U; ACHE, 5.0 ± 0.9 U Y PROTEÍNA, 60 ± 20 MICROGRAMOS.

E) COMPARACIÓN ENTRE LA CÁNULA TRADICIONAL Y LA CÁNULA RANURADA. PARÁMETROS FÍSICOS Y PARÁMETROS QUÍMICOS.

LOS PARÁMETROS QUE UTILIZAMOS PARA COMPARAR EL FUNCIONAMIENTO DE LA CÁNULA TRADICIONAL Y LA RANURADA, FUERON LOS EPISODIOS DE SANGRADO Y LAS OBSTRUCCIONES AL FLUJO QUE SE DETECTARON TANTO AL INICIO COMO DURANTE EL TRANCURSO DE LA PERFUSIÓN (TABLAS 5 Y 6).

EN LA TABLA 5, SE PRESENTAN LOS DATOS DE 20 PERFUSIONES EN TOTAL, LLEVADAS A CABO CON 2 DIFERENTES BOMBAS (RECÍPROCANTE Y POLISTÁLTICA) Y 2 DIFERENTES CÁNULAS (GADDUM Y RANURADA). LO ANTERIOR CON EL FÍN DE COMPARAR SU FUNCIONAMIENTO (EFICIENCIA) EN UNA PERFUSIÓN IN VIVO; TOMANDO COMO PARÁMETROS DE COMPARACIÓN LA FRECUENCIA DE OBSTRUCCIONES Y SANGRADOS.

COMO SE PODRÁ OBSERVAR, TOMANDO EN CUENTA EL NÚMERO DE PERFUSIONES REALIZADAS CON CADA UNA DE LAS BOMBAS Y CÁNULAS NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN CUANTO AL NÚMERO DE OBSTRUCCIONES Y SANGRADOS AL INICIO DE LA PERFUSIÓN; NO SUCEDIENDO LO MISMO AL COMPARAR LA FRECUENCIA DE LOS MISMOS PARÁMETROS DURANTE EL TRANCURSO DE LA PERFUSIÓN. EN ESTE LAPSO (DE LA COLECCIÓN 6 A LA 20) VEMOS QUE EL MAYOR NÚMERO DE ACCIDENTES (OBSTRUCCIONES, SANGRADOS) SE PRESENTA AL UTILIZAR LA BOMBA RECÍPROCANTE Y LA CÁNULA RANURADA.

NOTA.- ES PRECISO PUNTUALIZAR, QUE POSTERIORMENTE NOS DIMOS CUENTA QUE LA PARTE SUPERIOR DE LA CÁNULA RANURADA NO SELLABA PERFECTAMENTE.

EN LA TABLA 6 TENEMOS SEIS PERFUSIONES LLEVADAS A CABO CON

LA CÁNULA TRADICIONAL Y SEIS CON LA CÁNULA RANURADA. SE PUEDE OBSERVAR QUE EL MAYOR PORCENTAJE TANTO DE SANGRADOS, COMO DE OBSTRUCCIONES SE PRESENTARON EN LAS PERFUSIONES LLEVADAS A CABO CON LA CÁNULA TRADICIONAL. LA APARENTE CONTRADICCIÓN CON RESPECTO A LA TABLA 5 SE REVISARÁ EN EL APARTADO DE LA DISCUSIÓN .

ES INTERESANTE NOTAR QUE EN UN CONJUNTO DE 8 PERFUSIONES (TODAS EXITOSAS), LLEVADAS A CABO CON LA CÁNULA TRADICIONAL NO SE PRESENTÓ UNA SOLA OBSTRUCCIÓN. Y EN CUANTO A LOS SANGRADOS, APARECIERON MAYORMENTE AL INICIO DE LA PERFUSIÓN (CON LA INSERCIÓN DE LA CÁNULA).

POR ÚLTIMO EN LA TABLA 7 SE PRESENTAN LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS (LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS, DHL Y ^3H -GABA) QUE NOS SON ÚTILES EN LA COMPARACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE AMBAS CÁNULAS.

TABLA 5

	OBSTRUCCION			SANGRADO			P. realizadas	P. fallidas
	inicio	transcurso	final	inicio	transcurso	final		
B. Reciprocante	5	14	1	5	13	2	8	4 (50%)
B. Polistáltica	7	1	2	13	3	13	12	3 (25%)
C. Gaddum	5	4	2	8	5	5	10	3
C. Ranurada	7	11	1	10	11	10	10	4

En esta tabla se agrupan los datos de 20 perfusiones realizadas en globo pálido de rata (Wistar de 150 a 200 g de peso).

P. realizadas.- Perfusiones realizadas

P. fallidas.- Perfusiones fallidas

B. Reciprocante.- Bomba de jeringas

B. Polistáltica.- Bomba polistáltica (ó peristáltica)

C. Gaddum.- Cánula Gaddum-Myers

C. Ranurada.- Cánula modificada en ojal

inicio.- Colecciones de la 1 a la 5

transcurso.- Colecciones de la 6 a la 20

final.- Colecciones de la 21 en adelante

TABLA 6

COMPARACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO ENTRE LA CÁNULA GADDUM
Y LA CÁNULA DE OJAL: FRECUENCIA DE ACCIDENTES DURANTE
LA PERFUSIÓN.

	EPISODIOS DE SANGRADO	OBSTRUCCIONES DEL FLUJO (QUE REQUIEREN LA EXTRACCIÓN DE LA CÁNULA)
CÁNULA GADDUM	4 EN 6 PERFUSIONES (2 CON LA INSERCIÓN DE LA CÁNULA; 2 DURANTE LA PERFUSIÓN)	5 EN 6 PERFUSIONES
CÁNULA EN OJAL	1 EN 6 PERFUSIONES (CON LA INSERCIÓN DE LA CÁNULA)	1 (UNA) EN 6 PERFUSIONES.

ESTA TABLA MUESTRA LOS RESULTADOS DE UNA SERIE DE PERFUSIONES (12 EN TOTAL) CON 6 HORAS DE DURACIÓN. LLEVADAS A CABO PARA COMPARAR LA CÁNULA GADDUM Y LA RANURADA .

TODOS LOS EPISODIOS DE SANGRADO Y LAS OBSTRUCCIONES SEVERAS DEL FLUJO, FUERON ACOMPAÑADOS POR AUMENTO EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD DE DHL, EN LAS FRACCIONES DE LOS PERFUSADOS CORRESPONDIENTES.

TABLA 7

COMPARACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LA CÁNULA GADDUM Y LA RANURADA

ACTIVIDAD BASAL DE DHL EN LOS PERFUSADOS ^A	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.6
CONTENIDO DE PROTEÍNA EN PERFUSADOS. EN CONDICIONES BASALES ^A	30 ± 12	35 ± 15
CAPTACIÓN DE GABA H ³ ^B	28 ± 5	29 ± 6
LIBERACIÓN DE GABA H ³ ^B BASAL	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.04
POR ESTIMULACIÓN CON K ⁺	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02

RESULTADOS DE UNA SERIE DE 12 PERFUSIONES DE 6 HRS. DE DURACIÓN LLEVADAS A CABO EN GP DE RATA.

^A LOS VALORES DE DHL SON EXPRESADOS EN UNIDADES/ML Y LAS PROTEÍNAS EN UG/ML; $\bar{X} \pm SEM$ (SESIONES DE PERFUSIÓN N=6). LAS FRACCIONES DE PERFUSADO COLECTADAS DURANTE Ó DESPUÉS DE LOS ACCIDENTES EN LA PERFUSIÓN -- FUERON EXCLUÍDAS DE ESTE CÁLCULO.

^B LA PERFUSIÓN DE 3.5×10^6 CPM DE GABA H³ DURANTE 30 MIN. FUÉ SEGUIDA POR UN PERIODO DE LAVADO HASTA QUE SE ALCANZÓ UNA LIBERACIÓN BASAL. EL GABA QUE PERMANECIÓ EN EL TEJIDO (CAPTACIÓN) ES EXPRESADO COMO % DEL GABA H³ PERFUNDIDO. LOS VALORES DE LIBERACIÓN DE -- GABA SON EXPRESADOS COMO % DEL GABA EN EL TEJIDO $\bar{X} \pm SEM$ (N = 6).

DISCUSION

GRAN PARTE DE LOS RESULTADOS ESTÁ DIRECTAMENTE RELACIONADA CON EL DESARROLLO Y/O LA OPTIMIZACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS, TANTO DE PERFUSIÓN COMO BIOQUÍMICAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.

EN LO REFERENTE A LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN SE PRESENTARON 3 PUNTOS PRINCIPALES A RESOLVER: 1) OBSTRUCCIÓN DE LA CÁNULA 2) Desequilibrio en el influjo-eflujo del líquido de perfusión, 3) Sangrado durante la perfusión.

EL PROBLEMA DE LA OBSTRUCCIÓN DE LA CÁNULA TRAJÓ COMO CONSECUENCIA EL REDISEÑO EN LA PUNTA DE LA MISMA. UNO DE LOS MOTIVOS POR LOS CUÁLES SE DECIDIÓ PROTEGER LA PUNTA DE LA CÁNULA DE INFUSIÓN, FUÉ EL DE DISMINUIR LA AGRESIÓN DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN (PARA EL TEJIDO) AL SER EXPULSADO POR LA CÁNULA DE INFUSIÓN.

COMO YA SE OBSERVÓ EN LA TABLA 6 AL COMPARAR LOS 2 DISEÑOS DE LA PUNTA DE LA CÁNULA, TRADICIONAL (GADDUM) Y LA DE OJAL (RANURADA), PRÁCTICAMENTE NO HAY DIFERENCIA EN CUANTO AL DAÑO PROVOCADO POR LA INSERCIÓN DE CUALQUIERA DE LAS 2 CÁNULAS. SIN EMBARGO EN EL TRANCURSO DE LA PERFUSIÓN SE PRESENTÓ SANGRADO SOLO CON LA CÁNULA TRADICIONAL Y EL NÚMERO DE OBSTRUCCIONES FUÉ MAYOR 5 VECES EN LA CÁNULA TRADICIONAL QUE EN LA RANURADA.

ESTOS RESULTADOS MUESTRAN QUE LA MODIFICACIÓN EN LA PUNTA DE LA CÁNULA TRADICIONAL ES EXITOSA SOBRE TODO EN LO QUE SE REFIERE A LA DISMINUCIÓN DE OBSTRUCCIONES. ESTO ES DEBIDO EN GRAN PARTE A QUE SE PRESENTAN MENOS OBSTRUCCIONES EN LA

CÁNULA DE EXTRACCIÓN PERO TAMBIÉN ALGO QUE SE HACE NOTAR ES QUE EN LA CÁNULA DE INFUSIÓN AL ESTAR PROTEGIDA POR LA BASE DEL OJAL DEL TUBO DE EXTRACCIÓN LAS OBSTRUCCIONES DISMINUYEN CASI A CERO.

EN VISTA DE LO ANTERIOR PARECERÍA SORPRENDENTE QUE EN LOS RESULTADOS DE 8 PERFUSIONES REALIZADAS CON LA CÁNULA TRADICIONAL Y LA BOMBA POLISTÁLTICA, NO SE PRESENTÓ UNA SOLA OBSTRUCCIÓN. EN ESTE GRUPO DE EXPERIMENTOS QUE ES POSTERIOR -- (UN AÑO) A LOS DE LA TABLA 6, NO SE REALIZARON PERFUSIONES COMPARATIVAS CON LA CÁNULA RANURADA. SIN EMBARGO, HEMOS OBSERVADO EN EL LABORATORIO QUE EN LAS MANOS DE QUIÉN TENGA EXPERIENCIA EN EL MANEJO DE LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN CON LA CÁNULA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN, NO HABRÁ MUCHA DIFERENCIA EN LOS RESULTADOS AL UTILIZAR CUALQUIERA DE LAS 2 CÁNULAS; NO SUCEDIENDO LO MISMO CUANDO ALGUIEN SE INICIA EN ESTA TÉCNICA, YA QUE LA PERFUSIÓN LE PRESENTARÁ MENOS PROBLEMAS SI UTILIZA LA CÁNULA RANURADA.

TAMBIÉN ES APARENTEMENTE CONTRADICTORIO QUE EN LA TABLA 5 SE OBSERVE QUE EL MAYOR PORCENTAJE DE OBSTRUCCIONES Y SANGRADOS DURANTE LA PERFUSIÓN SE PRESENTÓ CON LA CÁNULA RANURADA Y NO CON LA TRADICIONAL. EN BUSCA DE UNA EXPLICACIÓN SE REVISÓ Y PROBÓ BAJO PRESIÓN TODO EL ENSAMBLAJE DE LA CÁNULA ENCONTRÁNDOSE QUE LA ROSCA QUE UNE LA CÁNULA DE INFUSIÓN Y LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN (Y A LA VEZ FUNCIONA COMO UNA PEQUEÑA CÁMARA) NO CERRABA HERMÉTICAMENTE, COSA QUE DISMINUYÓ NOTABLEMENTE LA EFICACIA DE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN PARA ABSORBER EL LÍQUIDO QUE SE INTRODUCÍA A TRAVÉS DE LA CÁNULA DE INFUSIÓN, FACILITANDO DE ESTA MANERA LA ESTASIS --

DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN CON LA CONSIGUIENTE LESIÓN DEL TEJIDO Y OBSTRUCCIÓN DE LA PUNTA DE LA CÁNULA, YA SEA POR EL MISMO TEJIDO Y/O POR COÁGULOS SANGUÍNEOS.

DE ACUERDO CON LOS DATOS ANTERIORES ES CLARA LA IMPORTANCIA QUE TIENE LA CONSTRUCCIÓN DE UNA CÁNULA EN SU TOTALIDAD, ADEMÁS DE LAS MODIFICACIONES QUE SE REALICEN EN LA PUNTA DE LA MISMA, QUE ES LA PORCIÓN EN CONTACTO DIRECTO CON LA ZONA DE PERFUSIÓN.

LA COMPARACIÓN DE AMBAS CÁNULAS NO SOLO SE REALIZÓ POR MEDIO DE PARÁMETROS FÍSICOS. EN LA TABLA 7 SE MUESTRA LA LIBERACIÓN DE ENZIMAS (DHL), PROTEÍNAS Y UN NEUROTRANSMISOR (³H-GABA) DE ACUERDO CON LOS DATOS MOSTRADOS EN DICHA TABLA NO EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN EL FUNCIONAMIENTO DE LAS 2 CÁNULAS (TRADICIONAL Y RANURADA). LO ANTERIOR IMPLICA QUE EL ÁREA DE PERFUSIÓN NO SE VE REDUCIDA AL UTILIZAR LA CÁNULA RANURADA.

EN LO QUE RESPECTA AL PUNTO 2), EL SISTEMA DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN DEBE REUNIR COMO MÍNIMO LOS SIGUIENTES REQUISITOS I) EQUILIBRIO DE PRESIONES Y DE FLUJOS EN LOS SISTEMAS DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN. II) CAPACIDAD DE MANTENER UN FLUJO CONTÍNUO DE PERFUSIÓN, QUE PERMITA EL CAMBIO DE MEDIOS DE PERFUSIÓN SIN NECESIDAD DE PARAR EL SISTEMA.

CON REFERENCIA AL PRIMER REQUISITO HAY QUE TOMAR EN CUENTA LA RESISTENCIA QUE PRESENTA AL FLUJO EL SISTEMA BIOLÓGICO. EN EL CASO DE QUE LA PRESIÓN DE LA CÁNULA DE INFUSIÓN (ENTRADA) SEA MAYOR QUE LA DE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN (SALIDA) SE CORRE EL RIESGO DE QUE SE QUEDE LÍQUIDO EN LA ZONA DE PERFUSIÓN CON LAS CONSECUENCIAS YA DESCRITAS. SI EL CA-

SO ES EL CONTRARIO, PRESIÓN DE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN MAYOR QUE LA DE LA CÁNULA DE INFUSIÓN; ENTONCES EL PROBLEMA QUE SE PRESENTA NO ES MENOS SERIO PUESTO QUE DEBIDO A LA FUERZA CON LA QUE SE EXTRAE EL LÍQUIDO SE PUEDE INCRUSTAR EL TEJIDO DE LA ZONA DE PERFUSIÓN EN LA PUNTA DE LA CÁNULA OCASIONANDO OBSTRUCCIÓN Y LESIÓN.

COMO UNA ALTERNATIVA, RESULTADOS DEL ÚLTIMO AÑO EN NUESTRO LABORATORIO ASÍ COMO EL TRABAJO DE NIEOULLON & COL. (1977A) Y EL DE PHILIPPU & COL. (1973), MUESTRAN QUE EL EQUILIBRIO DE FLUJOS SE PUEDE OBTENER SIN DESEQUILIBRIO DE PRESIÓN CON UN SISTEMA ABIERTO A LA PRESIÓN ATMOSFÉRICA.

OTRO PUNTO IMPORTANTE ES EVITAR CAMBIOS BRUSCOS EN LA PRESIÓN DEBIDOS POR EJ., AL APAGADO Y ENCENDIDO DE LA BOMBA DE PERFUSIÓN CON EL FIN DE CAMBIAR EL MEDIO DE PERFUSIÓN. LA DINÁMICA DEL SISTEMA DEPENDE EN GRAN PARTE DEL TIPO DE BOMBA QUE SE UTILICE. EN EL TRABAJO INICIAL HICIMOS USO DE 2 TIPOS DE BOMBA: LA DE JERINGAS Y LA POLISTÁLTICA. EL FUNCIONAMIENTO BÁSICO DE LA PRIMERA TANTO EN EL SISTEMA DE EXTRACCIÓN COMO EN EL SISTEMA DE INFUSIÓN ES A TRAVÉS DE JERINGAS, ESTA BOMBA OFRECE UNA VENTAJA PRINCIPAL: SE PUEDE GRADUAR EXACTAMENTE EL VOLUMEN DE ENTRADA Y EL DE SALIDA Y POR LO REGULAR NO HAY PROBLEMAS CON EL VOLUMEN DE RECUPERACIÓN, A MENOS QUE SE PRESENTEN OBSTRUCCIONES EN LA CÁNULA (FIG. 8). POR OTRA PARTE, PRESENTA UN GRAN INCONVENIENTE: PARA CAMBIAR LA JERINGA CON EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN (COSA QUE OCURRE CADA 15 MIN.) ES IMPRESCINDIBLE DETENER EL FLUJO LO CUÁL TRAE COMO CONSECUENCIA UN CAMBIO BRUSCO DE PRESIÓN EN EL ÁREA QUE SE ESTÁ PERFUNDIENDO Y, UNA ALTA POSIBILIDAD

DE QUE SE PRODUZCA LESIÓN (EN 1974 YAKSH & YAMAMURA REALIZARON EXPERIMENTOS EN LOS CUÁLES UTILIZARON ¹⁴C-UREA COMO MARCADOR EN PERFUSIONES REALIZADAS EN TÁLAMO DE RATAS Y OBSERVARON QUE LA CONCENTRACIÓN DE UREA AUMENTABA EN LOS PERFUSADOS DESPUÉS DE QUE SE PARABA LA BOMBA DE PERFUSIÓN POR UN CORTO PERIODO DE TIEMPO. DE ALLÍ LA ABSOLUTA NECESIDAD DE UN SISTEMA DE PERFUSIÓN CONTÍNUO Y, LA DE TENER EN CUENTA QUE DESPUÉS DE CUALQUIER DISTURBIO EN EL FLUJO DE LA PERFUSIÓN, UNA NUEVA LÍNEA BASAL DEBERÁ SER ESTABLECIDA).

EN CUANTO AL FUNCIONAMIENTO DE LA BOMBA POLISTÁLTICA, SE CARACTERIZA POR MANTENER UN SISTEMA CONTÍNUO DE PERFUSIÓN EN EL CUAL NO ES NECESARIO APAGAR LA BOMBA PARA CAMBIAR DE MEDIO DE PERFUSIÓN. EL ÚNICO, SI PUEDE LLAMARSE INCONVENIENTE QUE PRESENTA ESTA BOMBA ES QUE DEBE SER CUIDADOSAMENTE CALIBRADA, ANTES DE CADA PERFUSIÓN (ENTIÉNDASE POR CALIBRADA, EL LOGRO DE UN AJUSTE DINÁMICO ENTRE LA TUBERÍA DE INFUSIÓN Y LA TUBERÍA DE EXTRACCIÓN) Y AÚN ASÍ LOS VOLÚMENES COLECTADOS NO SERÁN TAN EXACTOS (COMO POR EJ. LOS QUE SE COLECTAN CON LA BOMBA DE JERINGAS, FIG. 6) SINO QUE PRESENTARÁN UN COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE 0.025 (FIG. 7).

ESTA VARIACIÓN ES AL PARECER EL RESULTADO DE UN EQUILIBRIO ENTRE LA RESISTENCIA DEL SISTEMA BIOLÓGICO Y LA FUERZA DE LA BOMBA POLISTÁLTICA PARA INFUNDIR Y EXTRAER EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN, ES DECIR CUANDO POR ALGUNA CAUSA (AUMENTO Ó DISMINUCIÓN DE LA RESISTENCIA BIOLÓGICA, VG. POR MOVIMIENTO DEL ANIMAL) LA CÁNULA DE INFUSIÓN INTRODUCE MENOS Ó MÁS LÍQUIDO, ESTE VOLUMEN SERÁ EL QUE RECUPERE LA CÁNULA DE EXTRACCIÓN.

POR SUPUESTO EL PERFIL DEL VOLUMEN SERÁ TOTALMENTE DISTINTO SI SE PRESENTA ALGÚN PROBLEMA HIDRODINÁMICO (POR EJ. - OBSTRUCCIÓN, FIG. 9).

ADEMÁS SOBRE TODO CON ESTA ÚLTIMA BOMBA HAY QUE TOMAR EN CUENTA LA ALTURA ADECUADA A LA QUE DEBE ESTAR LA SALIDA DE LA TUBERÍA DE INFUSIÓN Y POR ENDE LA SALIDA DE LA TUBERÍA DE EXTRACCIÓN PARA LOGRAR UN BUEN SISTEMA DE PRESIONES, - POR EXPERIENCIA PROPIA EL SISTEMA IDEAL ES AQUEL EN EL QUE LA SALIDA DE LA TUBERÍA DE INFUSIÓN Y LA TUBERÍA DE EXTRACCIÓN ESTÁN A UN MISMO NIVEL. EN LAS TABLAS 1,2 Y 3 SE HACE UNA COMPARACIÓN DEL USO DE AMBAS BOMBAS UTILIZANDO PARÁMETROS FÍSICOS (VOLUMEN DE RECUPERACIÓN, OBSTRUCCIÓN ETC.) Y BIOQUÍMICOS (LIBERACIÓN DE GABA H³, COMO INDICADOR DE ÉXITO EN UNA PERFUSIÓN). DE ESTA MANERA EN LAS PERFUSIONES -- 100% EXITOSAS SE OBSERVA QUE EL MAYOR PORCENTAJE (75%) SE LLEVÓ A CABO UTILIZANDO LA BOMBA POLISTÁLTICA. EN CAMBIO - EN LAS PERFUSIONES CON NULO ÉXITO EL PORCENTAJE MAYOR (66.6%) CORRESPONDÍO A LAS REALIZADAS CON LA BOMBA RECIPROCANTE.

LOS DATOS ANTERIORES SON OPTIMISTAS EN CUANTO AL USO DE LA BOMBA POLISTÁLTICA, SIN EMBARGO NO SE PUEDEN TOMAR COMO DECISIVOS YA QUE PARA EL ÉXITO DE UNA PERFUSIÓN HABRÁ QUE TOMAR EN CUENTA OTROS 2 FACTORES MUY IMPORTANTES: 1) EL TIPO DE CÁNULA QUE SE UTILIZE Y 11) LA EXPERIENCIA DE LA PERSONA QUE LLEVE A CABO LA PERFUSIÓN.

3) LA PRESENCIA MÁS Ó MENOS CONTÍNUA DE SANGRADO DURANTE LA PERFUSIÓN FUÉ UNO DE LOS PUNTOS QUE AMERITABAN SOLUCIÓN

INMEDIATA, DEBIDO A QUE ERA SIGNO IRREBATIBLE DE LESIÓN CELULAR Y POR LO TANTO LA MEDICIÓN DE MACROMOLÉCULAS (PROTEÍNAS, Vg.) Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS, DARÍA VALORES FALSOS. EN LOS PERFUSADOS CON LÍQUIDO HEMÁTICO LAS PROTEÍNAS Y TAMBIÉN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (DHL ESPECÍFICAMENTE) SE ENCUENTRAN MUY ELEVADAS DEBIDO, EN EL CASO DE LAS PROTEÍNAS A LAS PERTENECIENTES A LOS HEMATÍES Y A LAS PROPIAS DEL PLASMA Y, EN CUANTO A LA ACTIVIDAD DE DHL SE ENCONTRARÍA ELEVADA TAMBIÉN YA QUE AL SER UNA ENZIMA DE "ESCAPE", LA DESTRUCCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS LA "LIBERARÍA". ADEMÁS, LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES SE VERÍA DISMINUÍDA POR LA LESIÓN CAUSANTE DEL SANGRADO.

COMO YA SE MENCIONÓ AL INICIO UNA DE LAS PRINCIPALES CAUSAS POR LAS QUE SE PRESENTA SANGRADO ES EL MOVIMIENTO DE LA CÁNULA DENTRO DEL PARÉNQUIMA CEREBRAL. PARA EVITARLO EN UNA BUENA MEDIDA, SE DISEÑÓ UNA GUÍA QUE SUJETARA A LA CÁNULA IMPIDIENDOLE PRÁCTICAMENTE CUALQUIER MOVIMIENTO. LOS RESULTADOS OBTENIDOS FUERON BASTANTE SATISFACTORIOS YA QUE DISMINUYÓ (Ó CASI DESAPARECIÓ) EL MOVIMIENTO DE LA CÁNULA Y CONSECUENTEMENTE EL SANGRADO DURANTE LA PERFUSIÓN, SIENDO LO ANTERIOR IMPORTANTE PUESTO QUE SE TRADUJO EN UNA DISMINUCIÓN DE LA LESIÓN.

POR LO ANTERIORMENTE EXPUESTO SE PUEDE LLEGAR A LA CONCLUSIÓN DE QUE ENTRE MAYOR NÚMERO DE OBSTRUCCIONES, EXTRACCIONES DE LA CÁNULA Y COMO CONSECUENCIA PRESENCIA DE SANGRADO Y MENORES VOLÚMENES DE COLECCIÓN SE OBTENGAN DURANTE TODO EL ESPACIO TEMPORAL DE LA PERFUSIÓN (PRINCIPALMENTE SI SE PRESENTAN ESTOS ARTEFACTOS EN Ó ANTES DE CADA ESTIMULACIÓN

CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+) NO SE VA A OBTENER LIBERACIÓN DE GABA POSTERIOR A ESTIMULACIÓN QUÍMICA. ESTO ES INDICATIVO DE QUE EN ESAS CONDICIONES EL TEJIDO PERFUNDIDO NO RESPONDE COMO LO HARÍAN LAS CÉLULAS NEURONALES INTACTAS, A LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA LIBERANDO DETERMINADA SUBSTANCIA. EN LA FIG. 10 PODEMOS OBSERVAR QUE LA PRESENCIA DE SANGRADO AL INICIO DE LA PERFUSIÓN (INTRODUCCIÓN DE LA CÁNULA) Y/O AL FINAL DE LA MISMA (ESTIMULACIÓN MECÁNICA) NO INFLUYE PARA EL BUEN CURSO DE UNA PERFUSIÓN. SIN EMBARGO SI SE PRESENTA ANTES Ó DURANTE LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA, DISMINUYE EN GRAN MEDIDA LA POSIBILIDAD DE QUE EL NEUROTRANSMISOR SE LIBERE, YA QUE EL TEJIDO SE ENCUENTRA DAÑADO.

EN LO QUE RESPECTA A LAS OBSTRUCCIONES, SI EL PORCENTAJE DE LAS MISMAS ES ALTO DESDE EL INICIO DE LA PERFUSIÓN, ESTO YA NOS INDICA UNA BAJA PROBABILIDAD DE ÉXITO Y DEFINITIVAMENTE CUANDO LAS OBSTRUCCIONES SE PRESENTAN EN Ó CERCANAS A LA ESTIMULACIÓN QUÍMICA LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR NO SE LLEVARÁ A CABO.

MARCADORES.- EN ESTE TRABAJO SE EXPLORÓ LA UTILIDAD DE MEDIR VARIAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS, MATERIAL PROTEICO TOTAL Y LA LIBERACIÓN DE UN NEUROTRANSMISOR EXÓGENO (^3H -GABA) COMO INDICADORES DE DAÑO CELULAR Y VIABILIDAD DEL TEJIDO DURANTE LA PERFUSIÓN IN VIVO EN LA REGIÓN DEL ESTRIADO.

INICIALMENTE SE ESTUDIO LA LIBERACIÓN DE 2 POSIBLES MARCADORES DE LESIÓN (PROTEÍNA Y DHL) DURANTE LA PERFUSIÓN IN VIVO.

EN LOS RESULTADOS PRESENTADOS AQUÍ SE "LIBERA" GRAN CANTIDAD DE PROTEÍNA Y DHL CUANDO SE LLEVAN A CABO MANIOBRAS QUE PRODUCEN LESIÓN MECÁNICA EN LA ZONA DE PERFUSIÓN.

EN ACUERDO CON LO ANTERIOR EL PERFIL DE LIBERACIÓN DE DHL EN PERFUSIONES QUE SE CONSIDERAN 100% EXITOSAS DEMUESTRAN GRAN ACTIVIDAD DE DHL AL INICIO (CUANDO SE INSERTA LA CÁNULA) Y AL FINAL DE LA PERFUSIÓN (EN LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA), MIENTRAS QUE EN EL PERIODO COMPRENDIDO ENTRE AMBOS ACONTECIMIENTOS SE OBSERVA UNA "LIBERACIÓN" REALMENTE BAJA QUE PODRÍA CONSIDERARSE COMO BASAL; ADEMÁS HABRÍA QUE HACER NOTAR QUE NO HAY PICOS DE LIBERACIÓN CUANDO SE REALIZA ESTIMULACIÓN QUÍMICA (FIG.25,26), A DIFERENCIA DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL QUE ADEMÁS DE LA "LIBERACIÓN" DE PROTEÍNAS TAMBIÉN AL INICIO Y AL FINAL DE LA PERFUSIÓN SE PUEDEN OBSERVAR PICOS (AUNQUE PEQUEÑOS) DE LIBERACIÓN CUANDO SE ESTIMULA QUÍMICAMENTE LA ZONA DE PERFUSIÓN (FIG.22).

DE LO ANTERIOR PUEDE DEDUCIRSE QUE LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE DHL EN LOS PERFUSADOS PUEDE FUNCIONAR COMO MARCADOR DE LESIÓN CELULAR, PUESTO QUE SOLO SE DETECTA EN GRAN

CANTIDAD CUANDO HAY DAÑO TISULAR, NO LIBERÁNDOSE EN RESPUESTA A ESTÍMULOS QUÍMICOS.

ESTOS RESULTADOS INDICAN QUE EL DAÑO TISULAR ES MARCADO POR ELEVACIONES DE PROTEÍNA Y DHL.

CABE MENCIONAR QUE NO SOLO CON LESIÓN MECÁNICA PROVOCADA SE PRESENTA LIBERACIÓN DE PROTEÍNA. TAMBIÉN CUANDO SE LESIONA EL TEJIDO EN FORMA ACCIDENTAL, V.G. CUANDO LA RATA PRESENTA MOVIMIENTOS BRUSCOS Ó HAY ALGÚN ACCIDENTE DEL TIPO DE BALLA ELÉCTRICA (APAGADO DE LA BOMBA DE PERFUSIÓN) SE DETECTA GRAN LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS (FIG. 21). ES FACTIBLE HIPOTETIZAR QUE LO MISMO SUCEDE CON LA DHL POR EJEMPLO. SIN EMBARGO, CERCA DEL 10% DE LAS ELEVACIONES DE DHL Y PROTEÍNA DETECTADAS EN PERFUSIONES INDIVIDUALES SE PRESENTAN EN LA AUSENCIA DE PROBLEMAS OBVIOS EN LA PERFUSIÓN, SUGIRIENDO QUE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS SON MÁS SENSIBLES EN LA DETECCIÓN DEL DAÑO TISULAR QUE LAS OBSERVACIONES FÍSICAS (SANGRADO, DÉFICIT DE VOLUMEN EN LOS PERFUSADOS ETC.).

EN LO QUE RESPECTA A LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS PERFUSADOS, POR LOS DATOS ANTERIORES PUEDEN TOMARSE COMO MARCADORES QUE PODRÍAN INDICARNOS TANTO LESIÓN CELULAR, COMO LA PRESENCIA DE TEJIDO VIABLE QUE TIENE LA CAPACIDAD DE RESPONDER A UN ESTÍMULO QUÍMICO; LIBERANDO MATERIAL PROTEICO ENTRE OTRAS COSAS (V.G. NEUROTRANSMISORES) ; ASÍ COMO SE PRESENTA EN LA GRÁFICA 23 EL PICO DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL NC DE RATA POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA, SE ENCUENTRA CLARAMENTE POR ENCIMA DE LA BASAL; COMO SUCEDE EN LA ESTIMULACIÓN CORRESPONDIENTE A LA COLECCIÓN II Y A LA IB DONDE PRÁCTICAMENTE LA LIBERACIÓN ES EL DOBLE DE LA BA-

CANTIDAD CUANDO HAY DAÑO TISULAR, NO LIBERÁNDOSE EN RESPUESTA A ESTÍMULOS QUÍMICOS.

ESTOS RESULTADOS INDICAN QUE EL DAÑO TISULAR ES MARCADO POR ELEVACIONES DE PROTEÍNA Y DHL.

CABE MENCIONAR QUE NO SOLO CON LESIÓN MECÁNICA PROVOCADA SE PRESENTA LIBERACIÓN DE PROTEÍNA. TAMBIÉN CUANDO SE LESIONA EL TEJIDO EN FORMA ACCIDENTAL, VG. CUANDO LA RATA PRESENTA MOVIMIENTOS BRUSCOS Ó HAY ALGÚN ACCIDENTE DEL TIPO DE BALLA ELÉCTRICA (APAGADO DE LA BOMBA DE PERFUSIÓN) SE DETECTA GRAN LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS (FIG. 21). ES FACTIBLE HIPOTETIZAR QUE LO MISMO SUCEDE CON LA DHL POR EJEMPLO. SIN EMBARGO, CERCA DEL 10% DE LAS ELEVACIONES DE DHL Y PROTEÍNA DETECTADAS EN PERFUSIONES INDIVIDUALES SE PRESENTAN EN LA AUSENCIA DE PROBLEMAS OBVIOS EN LA PERFUSIÓN, SUGIRIENDO QUE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS SON MÁS SENSIBLES EN LA DETECCIÓN DEL DAÑO TISULAR QUE LAS OBSERVACIONES FÍSICAS (SANGRADO, DÉFICIT DE VOLUMEN EN LOS PERFUSADOS ETC.).

EN LO QUE RESPECTA A LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS PERFUSADOS, POR LOS DATOS ANTERIORES PUEDEN TOMARSE COMO MARCADORES QUE PODRÍAN INDICARNOS TANTO LESIÓN CELULAR, COMO LA PRESENCIA DE TEJIDO VIABLE QUE TIENE LA CAPACIDAD DE RESPONDER A UN ESTÍMULO QUÍMICO; LIBERANDO MATERIAL PROTEICO ENTRE OTRAS COSAS (VG. NEUROTRANSMISORES). ASÍ COMO SE PRESENTA EN LA GRÁFICA 23 EL PICO DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL NC DE RATA POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA, SE ENCUENTRA CLARAMENTE POR ENCIMA DE LA BASAL; COMO SUCEDE EN LA ESTIMULACIÓN CORRESPONDIENTE A LA COLECCIÓN 11 Y A LA 18 DONDE PRÁCTICAMENTE LA LIBERACIÓN ES EL DOBLE DE LA BA-

SAL (3 MESES DESPUÉS DE QUE OBTUVIMOS ESTOS RESULTADOS, RECIBIMOS LA NOTICIA DE QUE EL GRUPO DE GREENFIELD YA TENÍA EN PRENSA UN ARTÍCULO DONDE DEMOSTRABA LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS EN SUSTANCIA NEGRA Y NÚCLEO CAUDADO DE GATOS ANESTESIADOS). ES PERTINENTE MENCIONAR QUE EN 1975, DRUCKER-COLÍN & COL. MUESTRAN LA LIBERACIÓN FISIOLÓGICA (NO INDUCIDA QUÍMICAMENTE) DE MRL EN LA FORMACIÓN RETICULAR MESENFÁLICA DE GATO.

LIBERACIÓN DE ACHE Y PROTEASAS.- EN LA TABLA 4 SE MUESTRA QUE ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ ESTIMULAN LA LIBERACIÓN DE ACHE EN EL NC DE RATA. NO SE OBSERVÓ LIBERACIÓN INDUCIDA DE PROTEASAS POR DEPOLARIZACIÓN.

EN COMPARACIÓN CON LO ANTERIOR, LA "LIBERACIÓN" MECÁNICAMENTE INDUCIDA SIEMPRE FUÉ MAYOR QUE LA PROVOCADA POR DEPOLARIZACIÓN.

LOS RESULTADOS PRESENTADOS ANTES INDICAN QUE EN ALGÚN GRADO LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS PUEDE SER UTILIZADA COMO MARCADOR DE DAÑO CELULAR EN UNA PERFUSIÓN DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN.

EN CUANTO AL MATERIAL PROTEICO Y A LA ACTIVIDAD DE ACHE, GREENFIELD & COL. (1980, 1983) YA HABÍAN REPORTADO QUE SON LIBERADOS DESPUÉS DE ESTIMULAR CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ LA SN Y EL NC EN GATOS ANESTESIADOS.

LOS RESULTADOS AQUÍ EXPUESTOS CONFIRMAN Y EXTIENDEN ESTAS OBSERVACIONES A LA REGIÓN DEL CAUDADO Y DEL GLOBO PÁLIDO EN RATAS MOVIÉNDOSE LIBREMENTE.

LA POSIBILIDAD DE DETECTAR EL DAÑO CELULAR QUE SE PRESENTA EN LAS PERFUSIONES IN VIVO NO ES SUFICIENTE PARA LA VALI

DACIÓN DE UN SISTEMA PARTICULAR DE PERFUSIÓN, ES IMPORTANTE QUE ADEMÁS SE TENGAN PRUEBAS DE LA FUNCIONALIDAD DE LA PREPARACIÓN DURANTE LA PERFUSIÓN PARA ESTABLECER EL VALOR DE ESTAS TÉCNICAS.

LA HABILIDAD DEL TEJIDO PARA LIBERAR TRANSMISORES PUEDE SER UTILIZADA PARA ESTE PROPÓSITO, EN LA FIG. 19 SE MUESTRA LA LIBERACIÓN IN VIVO, EN FORMA BASAL Y POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA DE ^3H -GABA EXÓGENO.

COMO FUE DESCRITO EN MÉTODOS, DESPUÉS DE UN PERIODO DE LAVADO LA LIBERACIÓN DE ^3H -GABA FUE PROVOCADA POR ALTAS CONCENTRACIONES DE K^+ EN EL MEDIO DE PERFUSIÓN, ESTIMULACIONES REPETIDAS LIBERARON CANTIDADES MÁS BAJAS DEL TRAZADOR. ESTE DECREMENTO PUEDE DEBERSE AL METABOLISMO DEL ^3H -GABA Y SU DISMINUCIÓN (GASTO) EN LAS POZAS CELULARES, SIN REFLEJAR UN DAÑO TISULAR PROGRESIVO (FIG. 19, FIG. 20).

IMPORTANCIA DE LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS Y ACHE.- UNA VEZ QUE SE HA DETECTADO LA LIBERACIÓN DE ALGUNA MACROMOLÉCULA (VG. PROTEÍNAS, ENZIMAS); PODRÁN REALIZARSE LOS SIGUIENTES PASOS: 1) AISLAMIENTO DE LA MISMA. 2) ESPECIFICACIÓN DE SU ESTRUCTURA. 3) ESPECIFICACIÓN DE SU FUNCIÓN Y/O POSIBLE APLICACIÓN.

EN CUANTO AL PUNTO 3, POR EJ. CON RESPECTO A LAS PROTEÍNAS PUDIERA ESTUDIARSE ADEMÁS DE SU LIBERACIÓN, SU RECAMBIO (METABOLISMO) EN DIFERENTES ESTADOS CEREBRALES, YA SEA FISIOLÓGICOS (VG. SUEÑO) Ó PATOLÓGICOS (VG. EPILEPSIA).

EN REALIDAD AÚN EXISTEN VARIOS ESPACIOS POR LLENAR EN LO QUE RESPECTA A LA FUNCIÓN DEL MATERIAL QUE SE LIBERA AL ESPACIO EXTRACELULAR JUNTO CON EL NEUROTRANSMISOR.

CONCLUSIONES

UNO DE LOS MOTIVOS PRINCIPALES POR LOS QUE SE PRESENTA OBSTRUCCIÓN EN LA CÁNULA DE PERFUSIÓN DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN Y/O SANGRADO DURANTE LA PERFUSIÓN, ES LA EROSIÓN DEL TEJIDO LA CUÁL DISMINUYE EN GRAN MEDIDA AL MANTENER LA PUNTA DE LA CÁNULA PUSH DENTRO DE LA CÁNULA PULL (PHILIPPU & COL. 1973). SIN EMBARGO, AUNQUE ESTE DISEÑO LIBRA AL TEJIDO DE LOS EFECTOS MECÁNICOS DIRECTOS DEL LÍQUIDO QUE EXPULSA LA CÁNULA PUSH, EL ÁREA DE CONTACTO CON EL TEJIDO SE VE REDUCIDA A LA LUZ INTERNA DE LA CÁNULA PULL. EN ESTE TRABAJO DE TESIS HICIMOS USO (ADEMÁS DE LA CÁNULA GADDUM-MYERS) DE UNA CÁNULA QUE MANTENIENDO LA PUNTA DE LA CÁNULA PUSH CUBIERTA, PERMITE UN ÁREA DE CONTACTO MAYOR CON EL TEJIDO (AÚN UTILIZANDO TUBERÍA PULL DE DIÁMETRO PEQUEÑO: 0.7 MM).

COMO YA QUEDÓ EXPUESTO EN LOS RESULTADOS PARA EL BUEN ÉXITO DE UNA PERFUSIÓN IN VIVO, TODO EL SISTEMA DE PERFUSIÓN DEBE ENCONTRARSE EN CONDICIONES ÓPTIMAS ESTO ES: CÁNULAS BIEN CONSTRUÍDAS, TUBERÍA ADECUADA, BOMBA DE PERFUSIÓN QUE MANTENGA UN FLUJO CONTÍNUO Y, LA PERSONA QUE LLEVE A CABO TANTO LA IMPLANTACIÓN DE LOS ANIMALES EXPERIMENTALES COMO LA PERFUSIÓN, DEBE POSEER CIERTA EXPERIENCIA.

EN CUANTO SE CONTÓ CON UN SISTEMA DE PERFUSIÓN IN VIVO ADECUADO INICIAMOS LA PARTE DE LA VALIDACIÓN DEL MISMO, PARA ESTO DESARROLLAMOS Y ADAPTAMOS TÉCNICAS DE MEDICIÓN PARA DETECTAR LOS NIVELES BAJOS DE PROTEÍNAS Y LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS (DHL, ACHE, PROTEASAS) QUE SE ENCUENTRAN EN LOS PERFUSADOS DE CEREBRO.

LAS TÉCNICAS BIOQUÍMICAS ANTES MENCIONADAS LAS UTILIZAMOS PARA PROBAR SI LOS DATOS OBTENIDOS DE LOS PERFUSADOS ERAN LO SUFICIENTEMENTE CONFIABLES, COMO PARA DISCRIMINAR ENTRE LA LIBERACIÓN DE MACROMOLÉCULAS EN FORMA FISIOLÓGICA, DE AQUELLA OBTENIDA POR DAÑO AL TEJIDO.

DE ESTA FORMA, DESDE EL PUNTO DE VISTA BIOQUÍMICO OBTUVIMOS LOS SIGUIENTES HALLAZGOS:

1) LA ACTIVIDAD DE LA DHL Y, EN ESTE TRABAJO LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS SOLO AUMENTAN CUANDO SE PRESENTA LESIÓN CELULAR. POR LO TANTO PUEDEN CONSIDERARSE COMO MARCADORES ESPECÍFICOS DE DAÑO CELULAR Y SER UTILIZADAS PARA MONITOREAR EL CURSO DE UNA PERFUSIÓN.

2) EXISTE UNA CORRELACIÓN ENTRE LA LESIÓN TISULAR OBSERVADA FÍSICAMENTE (SANGRADO, DISMINUCIÓN Ó AUSENCIA DEL VOLUMEN DE COLECCIÓN EN UNA PERFUSIÓN DE INFUSIÓN-EXTRACCIÓN) Y LA PRESENCIA DE MARCADORES BIOQUÍMICOS (Vg. DHL).

3) ES POSIBLE LOGRAR LA LIBERACIÓN IN VIVO DE MATERIAL REACTIVO AL LOWRY (PROTEÍNAS) Y DE ACTIVIDAD DE ACHE POR MEDIO DE AGENTES DEPOLARIZANTES (K^+ 49 MM) EN NC Y GP DE RATA.

4) LA LIBERACIÓN PROVOCADA DE PROTEÍNA, ACTIVIDAD DE ACHE Y NEUROTRANSMISORES (EN ESTE CASO 3H -GABA) PUEDE SER UTILIZADA COMO MARCADOR DE VIABILIDAD TISULAR.

DE ACUERDO CON LO EXPUESTO ANTERIORMENTE LAS PROTEÍNAS Y LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LA DHL, ACHE Y MUY POSIBLEMENTE LAS PROTEASAS PUEDEN SER UTILIZADAS COMO MARCADORES BIOQUÍMICOS QUE DETERMINARÁN VIABILIDAD Ó LESIÓN CELULAR.

APENDICE

ORIGEN DE LAS DIFERENTES MOLÉCULAS DETECTABLES EN LOS PERFUSADOS.

PROTEÍNAS.- ES SABIDO QUE LA MAQUINARIA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN LA NEURONA SE ENCUENTRA LOCALIZADA DENTRO DEL PERIKARION, EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO, CONCENTRADA EN LOS CUERPOS DE NISSL.

LA MAYORÍA DE LAS PROTEÍNAS SINTETIZADAS SON TRANSPORTADAS A TRAVÉS DEL FLUJO AXOPLÁSMICO Y OTROS MECANISMOS DE TRANSPORTE EN DIRECCIÓN HACIA LA TERMINAL (WEISS 1961; SCHMITT 1968).

YA EN 1977 FINES & GARWOOD UTILIZANDO UN SISTEMA IN VITRO (GANGLIO ESPINAL-NERVIIO CIÁTICO-MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RANA) DEMOSTRARON QUE LA PROTEÍNA PRODUCIDA EN EL GANGLIO ERA CONDUcida A LA TERMINAL MEDIANTE EL TRANSPORTE AXONAL RÁPIDO (5 MM/HR.). ADEMÁS ENCONTRARON QUE PARTE DE LA PROTEÍNA LIBERADA POR EL NERVIIO CIÁTICO ES AL PARECER SINTETIZADA POR LAS CÉLULAS DE SCHAWNN; MUSICK (1979) TAMBIÉN MENCIONA A LAS CÉLULAS DE SCHAWNN COMO PRODUCTORAS EN PARTE, DEL MATERIAL PROTEICO LIBERADO EN PREPARACIONES DE NERVIIO FRÉNICÓ-MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO DE RATA.

EL MISMO MUSICK EN 1979 POSTULA QUE EL MECANISMO DE LIBERACIÓN DEL MATERIAL REACTIVO AL LOWRY (MRL) ASOCIADO A LA LIBERACIÓN DE ACH ES APARENTEMENTE DISTINTO DE LA SECRECIÓN DE PROTEÍNA VESICULAR SOLUBLE QUE SE PRESENTA EN LAS SINAPSIS ADRENÉRGICAS (CUBEDDU ET AL., 1974; GEFFEN ET AL., 1970; GEWIRTZ & KOPIN 1970; SMITH ET AL., 1970; WEINSHILBOUM ET AL., 1971).

DE ACUERDO CON MUSICK, LA CANTIDAD DE MRL LIBERADO POR

VESÍCULA SINÁPTICA (EN PREPARACIONES DE NERVIOS CIÁTICO MÚSCULO SARTORIO DE RANA) EXCEDIÓ EL CONTENIDO VESICULAR EN 25 A 150 VECES. DE TAL MANERA, QUE AL PARECER LA MAYORÍA DEL MRL LIBERADO EN ASOCIACIÓN CON LA ACh, NO ES DERIVADO DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS; POR LO QUE MECANISMOS ALTERNATIVOS DE LIBERACIÓN DEBEN TOMARSE EN CUENTA PARA EL EXCESO DE MATERIAL LIBERADO, EN RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS DE LAS - CUÁLES LA ACh SE PIENSA QUE ES LIBERADA.

TAMBIÉN LA CANTIDAD DE MRL LIBERADA EN UNA RESPUESTA MÁXIMA DEL DIAFRAGMA DE RATA, SE CALCULA QUE EXCEDE AL MENOS 3 VECES EL CONTENIDO DE LAS TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS DERIVADO DEL VOLUMEN DE UNA SOLA TERMINAL. DE ESTA MANERA ES IMPROBABLE QUE LAS TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS SEAN EL ÚNICO ORIGEN DEL MRL LIBERADO.

LA LIBERACIÓN DE ACh Y "SUBSTANCIAS NO TRANSMISORAS" - DE LAS TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS PUEDE SER SEGUIDA POR UN PROCESO DE AMPLIFICACIÓN QUE INCREMENTA LA CANTIDAD DE MRL LIBERADO EN LA PREPARACIÓN, EN RELACIÓN - A LA CANTIDAD DE MATERIAL LIBERADO DE LAS TERMINALES NERVIOSAS.

EXISTE UNA HIPÓTESIS PARA EXPLICAR EL MECANISMO DE LIBERACIÓN, LA CUÁL POSTULA QUE EXISTE UNA PROTEÓLISIS - EXTRACELULAR RESPONSABLE DE LA AMPLIFICACIÓN DE LA RES PUESTA.

POBERAI Y COL. (1972) HAN DEMOSTRADO POR MÉTODOS HISTOQUÍMICOS QUE LA ESTIMULACIÓN NERVIOSA MUSCULAR ESTÁ ASOCIADA CON UN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE ENDO Y EXOPEPTIDASA EN LA REGIÓN DE LA PLACA TERMINAL DEL MÚSCU-

LO ESQUELÉTICO DE RATA.

LA CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR INDICA QUE EL MRL LIBERADO - JUNTO CON LA ACH ESTÁ COMPUESTO PRINCIPALMENTE DE PÉPTIDOS PEQUEÑOS ($>10,000$ DALTONES) Y/O AMINOÁCIDOS (MUSICK 1977). LA PRESENCIA DE DERIVADOS DE PROTEÍNA PREDOMINANTEMENTE PEQUEÑOS ESTÁ DE ACUERDO CON LA HIPÓTESIS DE QUE LA LIBERACIÓN DE MRL ES SECUNDARIA A LA LIBERACIÓN DE EXOPEPTIDASAS EN LAS TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS (LA LIBERACIÓN DE ACTIVADORES DE PROTEASAS Ó LA CAPTACIÓN DE INHIBIDORES).

EL MODELO PROTEOLÍTICO PROPUESTO PARA LA LIBERACIÓN DE MRL, AÚN NO EXPLICA DEL TODO LA DISCREPANCIA ENTRE LA CANTIDAD - LIBERADA Y EL CONTENIDO DE LAS ESTRUCTURAS EN LAS TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS.

ES POSIBLE QUE UNA CANTIDAD SUBSTANCIAL DEL MRL LIBERADO - JUNTO CON LA ACH PROVENGA DE CÉLULAS DIFERENTES A LAS NEURONAS, MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE UN PROCESO SECRETORIO INDEPENDIENTE A TRAVÉS DE LA LIBERACIÓN DE UN PRODUCTO DE LAS - TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS. NO HAY QUE OLVIDAR (COMO YA - SE EXPUSO ANTERIORMENTE) A LAS CÉLULAS DE SCHAWNN COMO ORIGINARIAS DE PARTE DEL MATERIAL PROTEICO LIBERADO.

OTRO PUNTO DE DISCUSIÓN SOBRE EL POSIBLE ORIGEN DE LAS - PROTEÍNAS (MRL) DETECTADAS EN LOS PERFUSADOS, EMERGE DE LA POSTULACIÓN DE QUE ES POSIBLE QUE HAYA MOVIMIENTO DE LAS - PROTEÍNAS DEL SUERO HACIA EL CEREBRO.

LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA OPERA AL NIVEL DE LA MICROCIRCULACIÓN DE UNA FORMA ALTAMENTE SELECTIVA. UN ERROR COMÚN ACERCA DE ESTA BARRERA ES EL CREER QUE SU EFECTIVIDAD PARA - EVITAR LA ENTRADA DE MOLÉCULAS AL CEREBRO DEPENDE SOLO DEL

TAMAÑO DE LAS MISMAS SIN CONSIDERAR SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y/O QUÍMICAS. EN REALIDAD EL PESO MOLECULAR EN EL CASO DE UN AMINOÁCIDO INDIVIDUAL NO ESTÁ RELACIONADO CON SU FACILIDAD PARA ENTRAR AL CEREBRO.

ALGUNOS DE LOS CRITERIOS PARA EVALUAR EL FLUJO DE UNA SUBSTANCIA ENTRE EL PLASMA Y EL TEJIDO NERVIOSO HAN SIDO DISCUTIDOS POR LEVIN Y SCICLI (1969). ADEMÁS LA ANATOMÍA DE LA BARRERA ENTRE VASOS SANGUÍNEOS Y LCR Y VASOS SANGUÍNEOS-ENCÉFALO (BARRERA HEMATOENCEFÁLICA) HA SIDO OBJETO DE UNA AMPLIA ESPECULACIÓN Y UNA EVALUACIÓN ULTRAESTRUCTURAL ELABORADA (LIVINGSTON, 1960; DAVSON, 1963). AUNQUE LA NEUROGLIA PUEDE ACTUAR COMO UNA HOJA ALREDEDOR DE LOS CAPILARES PARA FILTRAR EL PLASMA, AÚN NO ESTÁ CLARO QUE SEA EL ÚNICO ELEMENTO ESTRUCTURAL QUE REGULE EL TRANSPORTE DE SUBSTANCIAS ENTRE LA SANGRE Y EL CEREBRO, HABRÍA QUE PENSAR TAMBIÉN EN UN MECANISMO QUÍMICO COMO UNA POSIBILIDAD IGUALMENTE IMPORTANTE EN LA SELECTIVIDAD DE EL INTERCAMBIO DE MOLÉCULAS.

POR EJ. CAMBIOS DEL PH EN LA BARRERA ALTERARÍAN LA TRANSFERENCIA DE IONES H^+ Y OH^- . DE IGUAL MANERA CATIONES ESENCIALES TALES COMO Na^+ , K^+ , Ca^{2+} Y Mg^{2+} SON MANTENIDOS EN RELATIVA HOMEOSTASIS DENTRO DEL PARÉNQUIMA CEREBRAL INDEPENDIENTEMENTE DE LA PRESENCIA DE UNA EXCESIVA CONCENTRACIÓN DE ESTOS IONES EN LA SANGRE.

TAL COMO LAJTHA Y OTROS HAN DEMOSTRADO LA ESTEREOESPECIFICIDAD ES TAMBIÉN UN PUNTO VITAL EN LA PERMEABILIDAD CEREBRAL (LAJTHA & TOTH, 1963; NEMOTO & SEVRINGHAUS, 1971). POR EJ.- LOS L-AMINOÁCIDOS SON TRANSPORTADOS PREFERENCIALMENTE A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA (OLDENDORF, 1973A,B). EN

CONTRASTE VARIOS D-AMINOÁCIDOS SON CAPTADOS POR EL CEREBRO EN MUY BAJAS CONCENTRACIONES.

EN VISTA DE LOS HALLAZGOS ANTERIORES, OLDENDORF HA HECHO LA OBSERVACIÓN DE QUE UN SUPUESTO NEUROTRANSMISOR Ó ALGÚN OTRO FACTOR HUMORAL EL CUÁL TENGA UNA FUNCIÓN NERVIOSA ES RETENIDO Y LOCALIZADO EN EL PARÉNQUIMA CEREBRAL. DE ESTA MANERA - LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA ADEMÁS DE "SELECCIONAR" EL PASO DE SOLUTOS DEL PLASMA HACIA EL PARÉNQUIMA CEREBRAL, TAMBIÉN PARECE RESTRINGIR EL PASO DE FACTORES ESENCIALES EN LA DIRECCIÓN OPUESTA.

AGRESIÓN A LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.- EXISTEN VARIAS CONDICIONES PATOLÓGICAS QUE DAÑAN LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA, DE TAL MANERA QUE AÚN MOLÉCULAS DE PROTEÍNA PUEDEN INTRODUCIRSE AL PARÉNQUIMA CEREBRAL (BRIGHTMAN & COL., 1970) ASÍ SUBSTANCIAS COMO LA PENICILINA, LA CUÁL ORDINARIAMENTE SE ENCUENTRA EXCLUÍDA POR LA BARRERA, PUEDE AL IGUAL QUE OTRAS MUCHAS SUBSTANCIAS PENETRAR LA MISMA DURANTE UN CAMBIO MÓRBIDO, PRODUCIDO POR EJ. POR UN TUMOR Ó CUANDO EL CEREBRO HA SIDO LESIONADO DE ALGUNA OTRA MANERA, VG. POR EDEMA CEREBRAL, ESTADOS FULMINANTES DE ENFERMEDADES TALES COMO ENCEFALOPATÍAS E INCLUSO UNA DEFICIENCIA DE VITAMINA B EN LA DIETA PUEDE EXACERBAR LA SEVERIDAD DE UNA PERMEABILIDAD PATOLÓGICA (FÖLDI-BÖRCsök & FÖLDI, 1973). LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA TAMBIÉN PUEDE SER ALTERADA COMO RESULTADO DE UNA LESIÓN DE TIPO AGUDO COMO POR EJ. LA INSERCIÓN DE UNA CÁNULA Ó CUALQUIER OTRO ARTEFACTO DENTRO DEL PARÉNQUIMA CEREBRAL. ADEMÁS ES CLARO QUE CIERTAS DROGAS TALES COMO LA CLORPROMAZINA Y LA NORTRIPTILINA PUEDEN INDUCIR UN CAMBIO SELECTIVO

EN LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA. PARDRIDGE & COL., (1973) MUESTRAN QUE LA PERMEABILIDAD AL MANITOL, INULINA Y DOPAMINA ES AUMENTADA MEDIANTE ESTAS DROGAS Y ADEMÁS MUESTRA UNA FORMA DOSIS-DEPENDIENTE.

ESTA ACCIÓN, POSTULAN PUEDE SER DEBIDA A UNA LISIS IN VIVO DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES EN EL SISTEMA MICROVASCULAR CEREBRAL.

RAPOPORT & COL. (1971) HAN PROPUESTO QUE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA PUEDE SER REVERSIBLEMENTE INTERRUPTIDA POSIBLEMENTE POR LA APERTURA DE ESPACIOS ENTRE LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO VASCULAR. LOS ELECTROLITOS Y NO ELECTROLITOS QUE PO SEAN UNA SOLUBILIDAD DESPRECIABLE EN LOS LÍPIDOS PUEDEN TEM PORALMENTE ALTERAR LA BARRERA MIENTRAS QUE LOS NO-ELECTROLITOS SOLUBLES EN LÍPIDOS PUEDEN DAÑAR LA BARRERA IRREVERSIBLEMENTE (RAPOPORT & COL., 1972).

LA BARRERA CEREBRO-LCR TAMBIÉN HA SIDO ESTUDIADA EN VARIOS LABORATORIOS (VER REVISIÓN DE CSERR, 1971). SE CONOCEN NUME ROSOS FACTORES QUE INFLUENCIAN EL FLUJO BIDIRECCIONAL DE UNA SUBSTANCIA A TRAVÉS DE LA SUPERFICIE EPENDIMAL DE LOS VENTRÍCULOS CEREBRALES. ENTRE ESTOS FACTORES SE ENCUENTRAN EL TRANSPORTE ACTIVO, LA DIFUSIÓN PASIVA, LA CONCENTRACIÓN DE CATIONES, EL NIVEL DE CO_2 , LA SATURACIÓN DEL MECANISMO DE TRANSPORTE TRANSEPENDIMAL, EL GRADIENTE DE TENSIÓN OSMÓTICA, LA VELOCIDAD DE FORMACIÓN DEL LCR, LA MORFOLOGÍA MISMA DE LA PARED EPENDIMAL, LA PRESENCIA DE CIERTAS DROGAS Y AÚN LA EDAD DEL ANIMAL (LEE & OLSZEWSKI, 1960; FLEISCHHAUER 1961; DAVSON & POLLAY, 1963; KLATZO & COL., 1964; AMES & COL., 1965; CURL & POLLAY, 1968; LEVIN & SISSON, 1972; DOG-

GETT & SPENCER, 1972).

ALGO DE INTERÉS ES EL HECHO DE QUE SUBSTANCIAS CENTRALMENTE ACTIVAS TALES COMO LA ANGIOTENSINA II, PUEDEN PASAR DE LA SANGRE AL LCR PERO NO DENTRO DEL TEJIDO CEREBRAL (VOLICER & LOEW, 1971). POR SUPUESTO LA DINÁMICA DE TRANSPORTE E INTERCAMBIO ENTRE EL LCR Y EL CEREBRO, DE IONES Y MOLÉCULAS (Vg. Na^{2+} , K^{+} , GLUCOSA ETC.) PUEDE VARIAR GRANDEMENTE (BRØNDSTED 1970A,B; DAVSON & WELCH, 1971). EL FENÓMENO DE LA ABSORCIÓN Ó TRANSPORTE DEL ESPACIO CEREBROESPINAL AL TORRENTE SANGUÍNEO ES IGUALMENTE COMPLEJO.

HACIENDO REFERENCIA A GREENFIELD & COL. (1983) PODEMOS REFORZAR EL CONCEPTO DE QUE AL MENOS UN ALTO PORCENTAJE DE LA PROTEÍNA OBTENIDA POR ESTIMULACIÓN QUÍMICA NO PROVIENE DEL PLASMA, SINO QUE ES EL RESULTADO DE LA ESTIMULACIÓN NEURONAL YA QUE EN EXPERIMENTOS REALIZADOS POR LOS AUTORES (EN S.N.C. DE GATOS), LA ESTIMULACIÓN DE LA SN CON ALTAS CONCENTRACIONES DE K^{+} , DA COMO RESULTADO LA DISMINUCIÓN EN UN 30 A 50% DE LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL Y ACHÉ EN LA SN CONTRALATERAL, DE ESTO SE DEDUCE QUE POR LO MENOS EL 30% DE LA PROTEÍNA LIBERADA ES RESULTADO DE ACTIVIDAD NEURONAL. ADEMÁS ES MUY POCO PROBABLE QUE LA CONTAMINACIÓN DEL PLASMA CONTRIBUYA AL INCREMENTO EN PROTEÍNA TOTAL OBSERVADO DESPUÉS DE ESTIMULACIÓN QUÍMICA, YA QUE LA CONCENTRACIÓN DE UN COMPONENTE DE ESTAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COMO LO ES LA ACHÉ NO ESPECÍFICA (CUYA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ES 140 VECES MAYOR EN PLASMA QUE EN LOS PERFUSADOS) NO SE VE AFECTADA.

PROTEASAS.- DESDE EL DESCUBRIMIENTO DE LA CÉLULA NEUROSECRETORA POR SCHARRER (1928), EL SIGNIFICADO DE ESTE TIPO DE NEURONA PARA LA FUNCIÓN DEL S.N.C. HA COBRADO INTERÉS. LAS CÉLULAS NEUROSECRETORAS (CÉLULAS QUE TIENEN AMBAS FUNCIONES: NERVIOSA Y ENDOCRINA) ESTÁN PRESENTES EN EL SIST. NERVIOSO DESDE LOS CELEENTERADOS HASTA EL HOMBRE.

DE HECHO ALGUNOS AUTORES HAN POSTULADO QUE LA CÉLULA NEUROSECRETORA PUEDE SER UN ANTECEDENTE EVOLUCIONARIO DE LAS NEURONAS "CONVENCIONALES" LAS CUÁLES USAN PEQUEÑAS MOLÉCULAS TALES COMO LA ACH Ó AMINAS BIOGÉNICAS COMO NEUROTRANSMISORES (SCHARRER 1977; PAVANS 1974; FRONTALI & COL., 1977). PERO REGRESANDO A LAS CÉLULAS NEUROSECRETORAS, SE HA POSTULADO Y COMPROBADO ADEMÁS EN ALGUNOS CASOS QUE, SINTETIZAN LARGOS PRECURSORES DE HORMONAS LOS CUÁLES SON HIDROLIZADOS Y LOS PRODUCTOS RESULTANTES MODIFICADOS, CONSTITUYEN MOLÉCULAS ACTIVAS. DOCHERTY & STEINER HAN DIVIDIDO LOS PRECURSORES DENTRO DE 2 CLASES : LOS QUE SON LIBERADOS AL TORRENTE SANGUÍNEO Ó A LA MATRIZ DEL TEJIDO CONECTIVO Y SON PROCESADOS EXTRACELULARMENTE Y, AQUELLOS QUE SON PROCESADOS INTRACELULARMENTE. ÉSTOS ÚLTIMOS INCLUYEN LOS PRECURSORES DE LOS NEUROPEPTIDOS QUE A SU VEZ SE SUBDIVIDEN EN PREPROPEPTIDOS Y PROPEPTIDOS.

LOS PREPROPEPTIDOS SE CARACTERIZAN POR TENER EN SU EXTREMO AMINO-TERMINAL UNA CADENA DE APROXIMADAMENTE 30 AMINOÁCIDOS HIDROFÓBICOS A LOS CUÁLES SE LES CONOCE COMO "SEÑAL" Ó SECUENCIA LÍDER, LA CUÁL ES REMOVIDA DEL

PREPROPEPTIDO POR UNA "SEÑALASA" LA QUE AL PARECER SE ENCUENTRA EN LA SUPERFICIE LUMINAL DE LA MEMBRANA RETICULAR ENDOPLÁSMICA (TENEMOS AQUÍ UN EJEMPLO DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN LAS CÉLULAS NERVIOSAS).

LA PROINSULINA ES REPRESENTATIVA DE LA CLASE GENERAL DE PROPROTEÍNAS QUE SON PROCESADAS POSTRADUCCIONALMENTE - DENTRO DE SUS CÉLULAS SECRETORAS YA SEA DURANTE LA FORMACIÓN Y MADURACIÓN DE LOS GRÁNULOS SECRETORIOS (HORMONAS PÉPTIDICAS, NEUROTRANSMISORES ETC.) Ó DURANTE EL ENSAMBLAJE DE ESTRUCTURAS MACROMOLECULARES (CÁPSULAS VIRALES, COMPLEJOS ENZIMÁTICOS ASOCIADOS A MEMBRANA).

EL PRIMER GRUPO ES PROCESADO POR PROTEASAS ASOCIADAS AL GOLGI LAS CUÁLES TIENEN UNA ACTIVIDAD PARECIDA A LA TRIPSINA Y CARBOXIPEPTIDASA B.

DESDE MUCHOS PUNTOS DE VISTA REPRESENTA UNA VENTAJA EL CONOCER EL SITIO INTRACELULAR DEL PROCESAMIENTO DE LA PRO-PROTEÍNA YA QUE ASÍ LAS ENZIMAS DEL ORGANELO APROPIADO PUEDEN SER MEDIDAS . EN EL CASO DE LA PRO-OPIOMELANOCORTINA (PRO-OPIOCORTINA), ASÍ COMO CON MUCHAS OTRAS PRO-PROTEÍNAS EL PROCESAMIENTO SE PRESENTA INTRAGRANULARMENTE EN EL LÓBULO INTERMEDIO DE LA PITUITARIA A UN PH ÁCIDO (LOH & GRITSCH, 1981). DE AQUÍ QUE LOS GRÁNULOS SECRETORIOS PURIFICADOS PUEDAN SER UTILIZADOS COMO EL ORIGEN DE LAS ENZIMAS PROCESADORAS.

BROWNSTEIN & COL., (1980) PRESENTAN EVIDENCIA DE QUE GRAN PARTE DEL PROCESAMIENTO DE LAS PROHORMONAS TIENE LUGAR INTRAGRANULARMENTE. DE ESTA MANERA LOS GRÁNULOS DEBEN CONTENER TANTO EL PRECURSOR COMO LA ENZIMA RES--

PONSABLE DE SU PROCESAMIENTO POS-TRADUCCIONAL. EL CONTENIDO DE LOS GRÁNULOS (HORMONAS, PROTEÍNAS ACARREADORAS Y PARTES RESIDUALES DEL PRECURSOR) PARECEN SER LIBERADAS CUANDO LAS TERMINALES NERVIOSAS SON DEPOLARIZADAS. ESTA LIBERACIÓN INVOLUCRA UNA FUSIÓN DE LOS GRÁNULOS CON LA MEMBRANA TERMINAL SEGUIDA POR UNA APERTURA DE LOS MISMOS Y LIBERACIÓN DE SU CONTENIDO (DOUGLAS - 1974; DREIFUSS 1975; THORN & COL., 1978). ESTE PROCESO SE CONOCE COMO EXOCITOSIS.

A PESAR DE QUE EL ESTUDIO DE NUMEROSAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE HORMONAS HA DEMOSTRADO QUE LOS GRÁNULOS DE ALMACENAMIENTO Y LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS CONTIENEN ENZIMAS QUE ROMPEN LOS PRECURSORES NO SE HA ESTABLECIDO LA IDENTIDAD DE ESTAS ENZIMAS (VG. METALOPROTEASAS, SERINA PROTEASAS ETC.); ADEMÁS HABRÍA QUE VER SI LA ENZIMA SE ENCUENTRA UNIDA A LA MEMBRANA Y EN TAL CASO SABER SI ES LA REGLA PARA TODAS LAS PEPTIDASAS.

GREENFIELD & SHAWN (1984), PROPUSIERON QUE AL IGUAL QUE LA ACHÉ, ENZIMAS DEL TIPO DE AMINOPEPTIDASAS PODÍAN SER LIBERADAS DE NEURONAS EN EL S.N.C. MÁS ESPECÍFICAMENTE DE LA SUSTANCIA NEGRA .

LA HIPÓTESIS ANTERIOR SE REFORZÓ CUANDO ENCONTRARON QUE PODÍAN LOGRAR LA LIBERACIÓN EVOCADA POR AGONISTAS DE LA DOPAMINA (ANFETAMINAS) DE AMINOPEPTIDASAS NO SOLO LOCALMENTE, SINO TAMBIÉN EN LA CONEXIÓN NIGRO-ES TRIATAL CONTRALATERAL.

EL ROMPIMIENTO DE PREPROTEÍNAS SE PRESENTA RÁPIDAMENTE DESPUÉS DE SU SÍNTESIS (DORNER & KEMPER 1978; SHIELDS & BLOBEL 1978; PATZELT & COL., 1978) PRESUMIBLEMENTE -

POR ENZIMAS PROTEOLÍTICAS ASOCIADAS CON EL RETÍCULO EN DOPLÁSMICO RUGOSO Ó SU CONTRAPARTE DESPUÉS DE LA HOMOGENIZACIÓN CELULAR: LOS MICROSOMAS RUGOSOS EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS (BLOBEL & DOBBERSTEIN 1975), Ó LA MEMBRANA CELULAR EN LA BACTERIA (INOUE & COL., 1980).

LA ENZIMA MICROSOMAL EXHIBE UNA LATENCIA QUE PUEDE SER DESENMASCARADA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON DETERGENTES (JACKSON & BLOBEL 1977; KASCHNITZ & KREIL 1978; JACKSON & BLOBEL 1980). ESTOS HALLAZGOS HAN CONDUCIDO A LA PRESUNCIÓN DE QUE LA ENZIMA ESTÁ LOCALIZADA SOBRE EL LADO LUMINAL DE LA MEMBRANA MICROSOMAL. ADEMÁS HAY ALGUNA EVIDENCIA QUE INDICARÍA QUE LA ENZIMA PUEDE SER UNA METALO-PROTEASA (ZIMMERMAN & COL., 1980; ZWIZINSKI & WICKNER 1980).

ACETILCOLINESTERASA.- VARIOS INVESTIGADORES HAN DEMOSTRADO QUE OTRAS SUBSTANCIAS, ADEMÁS DE LOS NEUROTRANSMISORES PUEDEN SER LIBERADAS DE LOS NERVIOS MOTORES LUEGO DE ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA. LOS AMINOÁCIDOS (WHEELER & COL., 1966), ASÍ COMO LAS PROTEÍNAS (KORR & APPEL -- TAUER, 1971, 1977) SON PRESUMIBLEMENTE TRANSPORTADOS DISTALMENTE DESDE LOS CUERPOS CELULARES HASTA LAS TERMINALES NERVIOSAS DONDE SON LIBERADOS. AUNQUE NO SE HA COMPROBADO QUE LA AChE SEA LIBERADA DE LAS TERMINALES MÚSCULO-NERVIOSAS, SI SE HA DEMOSTRADO QUE SE LIBERA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO DE MÉDULA ESPINAL DE EMBRIÓN DE POLLO Y DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES BAÑADAS EN SOLUCIONES CON ALTO POTASIO (SOMOGYI, CHUBB & SMITH; 1975). EN EL ÚLTIMO CASO LA LIBERACIÓN SE DEMOSTRÓ QUE ERA DEPENDIENTE DE Ca^{2+} POR LO QUE SE CREYÓ QUE SE ORIGINABA POR LO MENOS EN PARTE DE LOS NERVIOS ESPLÁCNICOS.

EL CONTENIDO DE AChE EN MÚSCULO ES INFLUENCIADA POR LO MENOS EN PARTE POR LA NEURONA MOTORA (GUTH & COL., 1964; INESTROSA, RAMÍREZ, FERNANDEZ; 1976). LO ANTERIOR SE HA DEMOSTRADO POR LA REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AChE EN EL MÚSCULO DENERVADO, AUNQUE ESTE ÚLTIMO AÚN ASÍ ES CAPAZ DE SINTETIZAR AChE, LOS NIVELES DE LA ENZIMA NUNCA ALCANZAN AQUELLOS DE LOS CONTROLES DENERVADOS (KIAUTA & COL., 1977). ADEMÁS EL BLOQUEO DEL TRANSPORTE AXONAL DE LOS NERVIOS MOTORES CON COLCHICINA HA PRODUCIDO CAMBIOS COMO AQUELLOS OBSERVADOS EN LA DENERVACIÓN AUNQUE SIN EMBARGO NO SE INTERRUMPE LA TRANSMISIÓN NEUROMUSCULAR (FERNÁNDEZ & INESTROSA, 1976).

ESTOS RESULTADOS SUGIEREN QUE LA AChE MUSCULAR ES PARCIALMENTE REGULADA POR SUBSTANCIAS QUE SON TRANSPORTADAS A TRAVÉS DEL NERVIIO Y SON LIBERADAS POR LAS TERMINALES NERVIOSAS.

LOS AUTORES (SKAU & BRIMIJOIN, 1978) NO EXCLUYEN LA POSIBILIDAD DE QUE UNA DE ESTAS SUBSTANCIAS REGULATORIAS SEA LA MISMA AChE. NO HA SIDO DEMOSTRADO QUE LA ENZIMA SE ENCUENTRE ASOCIADA A LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS PERO SI SE HA ENCONTRADO LOCALIZADA EN LA CISTERNA DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO LISO EN LOS NERVIOS (SOMOGYI, CHUBB & SMITH; 1975). SE SUGIERE QUE ESTA CISTERNA PUEDE LIBERAR SU CONTENIDO CUANDO UN POTENCIAL DE ACCIÓN INVADDE LAS TERMINALES NERVIOSAS.

EL MECANISMO DE ESTA LIBERACIÓN PODRÍA TENER CARACTERÍSTICAS EN COMÚN, CON LA LIBERACIÓN EN FORMA DE EXOCITOSIS, QUE ES COMO SE LIBERAN LOS NEUROTRANSMISORES QUE SE ENCUENTRAN EN LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS.

EN CUANTO A LA PRESENCIA DE AChE EN EL LCR, DESDE HACE APROXIMADAMENTE 30 AÑOS DIVERSOS ESTUDIOS HAN PROVISTO BASES PARA LA POSTULACIÓN DE QUE LA ENZIMA ES LIBERADA DE LAS NEURONAS DEL S.N.C.

LA AChE ES LA COLINESTERASA PREDOMINANTE EN EL LCR DE HUMANOS (KALSBECK & COL., 1950; ENTRE OTROS), MIENTRAS QUE EL PLASMA SANGUÍNEO CONTIENE SOLO BUTIRILCOLINESTERASA (MENDEL & COL., 1943). EN EL CEREBRO LA AChE NO SOLO ES MÁS ABUNDANTE QUE LA BChE, SINO QUE TAMBIÉN SE ENCUENTRA PRESENTE EN 2 FORMAS: SOLUBLE Y UNIDA A LA MEMBRANA (HOLLUNGER & NIKLASSON, 1973)

LA ACHÉ ES LIBERADA DE LAS CÉLULAS CROMAFINES DE LA MÉDULA ADRENAL EN RESPUESTA A LA ADICIÓN DE UN EXCESO DE IONES DE K^+ Ó CARBACOL EN EL PERFUSADO Y, LA REMOCIÓN DE CALCIO DEL MISMO, INHIBE LA LIBERACIÓN. (CHUBB & SMITH, 1975). SI LA ACHÉ ES LIBERADA DEL TEJIDO PERIFÉRICO COMO RESULTADO DE EXCITACIÓN, ENTONCES UN BENÓMENO SIMILAR PODRÍA OCURRIR EN EL S.N.C.

CHUBB, GOODMAN & SMITH, 1976 ENCONTRARON QUE LOS SIGUIENTES TRATAMIENTOS LIBERABAN ACH CORTICAL, Vg. EN LA ESTIMULACIÓN NERVIOSA PERIFÉRICA LA CONCENTRACIÓN DE ACHÉ EN EL LCR DE CONEJO FUÉ REVERSIBLEMENTE AUMENTADA. LA DEDUCCIÓN DE ESTOS ESTUDIOS ES QUE LA ACHÉ PODRÍA SER LIBERADA DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN EL S.N.C. (GREENFIELD & SMITH, 1979). EN CONCORDANCIA CON LO ANTERIOR BAREGGI & GIACOBINI (1978) REFUERZAN LA MISMA HIPÓTESIS YA QUE EN SUS EXPERIMENTOS ENCONTRARON QUE LA CLORPROMAZINA, LA CUÁL INCREMENTA EL RECAMBIO DE ACH (TRABUCCHI & COL., 1974) Y LA SALIDA DE ACH (STADLER & COL., 1973), TAMBIÉN INCREMENTA LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ACHÉ EN EL LCR. FINALMENTE TAMBIÉN DEMOSTRARON QUE A) EN EL LCR DE PERRO EXISTE SOLAMENTE UNA ISOENZIMA DE LA ACHÉ; B) QUE ESTA ISOENZIMA ES LA MISMA QUE AQUELLA QUE ESTÁ PRESENTE EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DEL TEJIDO CEREBRAL Y, C) LA RELACIÓN ACHÉ/BUCHÉ ES 1/2.5 EN EL LCR Y 1/7 EN PLASMA. DE ACUERDO CON LOS HALLAZGOS ANTERIORES Y AQUELLOS ENCONTRADOS EN LA LITERATURA HAY UNA FUERTE INDICACIÓN DE QUE LA ACTIVIDAD DE ACHÉ PRESENTE EN EL LCR ES EN SU GRAN MAYORÍA DE ORI

GEN CEREBRAL Y PUEDE REFLEJAR ACTIVIDAD DE ACHÉ NEURONAL. GREENFIELD, CHUBB & SMITH EN 1979 TAMBIÉN ENCONTRARON QUE DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CLORPROMAZINA I.V. SE PRESENTÓ UN AUMENTO DE APROXIMADAMENTE 5 VECES EN LA CONCENTRACIÓN DE ACHÉ EN EL LCR DE CONEJO, PROVENIENTE DE LA CISTERNA MAGNA. LA POSIBILIDAD DE QUE ESTA ELEVACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA SEA EL RESULTADO DE UN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS CENTRALES ES TOMADA EN CUENTA. LA MISMA GREENFIELD Y COL. EN 1980 INVESTIGARON LA LIBERACIÓN IN VIVO DE LA ACHÉ, TANTO DE LA SN COMO DEL NC EN GATOS; OBSERVANDO LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE LA ENZIMA Y ADEMÁS AUMENTO LOCAL DE LA MISMA EN SN DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE K^+ 30 MM, ACOMPAÑADO ESTE RESULTADO POR CAMBIOS REMOTOS EN LA LIBERACIÓN DE ACHÉ EN LAS OTRAS 3 ESTRUCTURAS: MIENTRAS QUE LA LIBERACIÓN DE ACHÉ AUMENTÓ EN EL NC CONTRALATERAL, DISMINUYÓ EN EL IPSILATERAL Y LA SN CONTRALATERAL. LOS CAMBIOS DISTALES, OBSERVADOS EN LA LIBERACIÓN DE ACHÉ SUGIEREN QUE ESTE FENÓMENO TAMBIÉN SE PUEDE PRESENTAR EN EL S.N.C.; POR LO TANTO EXISTE Poca DUDA DE QUE LA LIBERACIÓN DE ACHÉ EN AMBAS REGIONES TENGA UN SIGNIFICADO FISIOLÓGICO. AUNQUE ESTUDIOS BIOQUÍMICOS E HISTOQUÍMICOS HAN INDICADO CLARAMENTE QUE UNA GRAN PROPORCIÓN DE LA ACHÉ ESTÁ PRESENTE EN LOS CUERPOS Y DENDRITAS DE LAS CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS, LA ACHÉ NIGRAL TIENE TAMBIÉN OTRA LOCALIZACIÓN. COMO SE DEMOSTRÓ EN LA SN DE RATA LAS LESIONES CON 6-HIDROXIDOPAMINA (LO CUÁL REDUCE LA ACTIVIDAD DE LA TIROSINA HIDROXILASA EN AL MENOS 90%) DISMINUYEN LA ACTIVIDAD DE LA ACHÉ EN UN 43% (LEHMANN, 1978). ADEMÁS LA ACHÉ NIGRAL SOLAMENTE FUÉ REDUCI

DA EN UN 44% DESPUÉS DE LA LESIÓN LOCAL CON ÁCIDO KAÍNICO , UNA NEUROTOXINA QUE COMPLETAMENTE DESTRUYE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS Y TAMBIÉN ES SABIDO QUE INDUCE LA DEGENERACIÓN DE OTRAS NEURONAS NIGRALES (NAGY & COL., 1977).

LA ACHÉ NO CONTENIDA EN LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS NO SE ORIGINA TAMPOCO AL PARECER DE LAS FIBRAS NIGRO-ESTRIATALES YA QUE LA LESIÓN CON ÁCIDO KAÍNICO NO AFECTA LOS NIVELES DE LA ENZIMA (LEHMANN & COL., 1979). ASÍ QUE LAS FIBRAS AFERENTES DE OTRAS REGIONES PODRÍAN ESTAR INVOLUCRADAS. DE HECHO LAS LESIONES ELECTROLÍTICAS DEL NÚCLEO CENTROMEDIAL DEL TÁLAMO REDUJERON LA ACTIVIDAD DE LA ACHÉ ASÍ COMO LA DE LA ACETILCOLÍNTANSFERASA EN UN 50% EN EL GATO (WAGNER & COL. 1975). DE AHÍ QUE LA ACTIVIDAD DE ACHÉ MEDIDA EN LOS PERFUSADOS DE LA SN Y NC PODRÍA ORIGINARSE DE SITIOS DIFERENTES A LOS DE LAS DENDRITAS Y/O TERMINALES DOPAMINÉRGICAS.

AHORA QUE AL PARECER SE ENCUENTRA BIEN ESTABLECIDO QUE LA ACHÉ SOLUBLE ES LIBERADA TANTO EN LA PERIFERIA (CHUBB & SMITH, 1975) COMO EN EL S.N.C. (CHUBB & COL., 1976; GREENFIELD & COL., 1979; FUENMAYOR & COL., 1976).

REFERENCIAS

- ALLES, G.A., HAWES, R.C. 1940. CHOLINESTERASES IN THE BLOOD OF MAN. J. BIOL. CHEM. 133: 375-90.
- ANES, A. III, HIGASHI, K. & NESBETT, F.B. 1965. RELATION OF POTASSIUM CONCENTRATION IN CHOROID-PLEXUS FLUID TO THAT IN PLASMA. J. PHYSIOL 181: 506-515.
- ANGLISTER, L. & SILMAN, I.: 1978. MOLECULAR STRUCTURE OF ELONGATED FORMS OF ELECTRIC EEL ACETYLCHOLINESTERASE. J. MOL. BIOL. 125: 293-311.
- AUGUSTINSSON, K.B., NACHMANSOHN, D. 1949. DISTINCTION BETWEEN ACETYLCHOLINESTERASE AND OTHER CHOLINE ESTERSPLITTING ENZYMES. SCIENCE 110: 98-99.
- AUGUSTINSSON, K.B.: 1963. CLASSIFICATION AND COMPARATIVE ENZYMOLOGY OF THE CHOLINESTERASES AND METHODS FOR THEIR DETERMINATION. HANDB EXP., PHARMACOL. 15: 89-128.
- BAREGGI, S.R. & GIACOBINI, E. 1978. ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN VENTRICULAR AND CISTERNALE CSF OF DOGS. EFFECT OF CHLORPROMAZINE. J. OF NEUROSCIENCE RES. 3: 335-339.
- BARNETT, P. & ROSENBERRY, T.L. 1979. FUNCTIONAL IDENTITY OF CATALYTIC SUBUNITS OF ACETYLCHOLINESTERASE. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 567: 154-160.
- BARTON, A.J., BLYGH, J. & SHARMAN, D.F. 1969. J. PHYSIOL. 200: 26-27 P.
- BATTACHARYA, B.K. & FELDBERG, W. 1958. PERFUSION OF CEREBRAL VENTRICLES, EFFECTS OF DRUGS ON OUTFLOW FROM THE CISTERNA AND THE AQUEDUCT. BRIT. J. PHARMACOL. 13: 156-162.

BATTACHARYA, B.K. & FELDBERG, W. 1958. PERFUSION OF CEREBRAL VENTRICLES: ASSAY OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE EFFLUENT FROM THE CISTERNA AND THE AQUEDUCT. BRIT. J. PHARMACOL. 13: 163-174.

BAYÓN, A., DRUCKER-COLÍN, R., LUGO, L., SHOEMAKER, W.J., AZAD R. AND BLOOM, F.E. 1981. IN VIVO RELEASE OF ENKEPHALIN FROM THE GLOBUS PALLIDUS IS TONICALLY INHIBITED BY ENDOGENOUS GABA. SOC. NEUROSCI. ABSTR. 7:800.

BAYÓN, A. & DRUCKER, R.R. 1985. METHODOLOGICAL ALTERNATIVES & EXPERIMENTAL STRATEGIES FOR STUDYING IN VIVO PERFUSION AND RELEASE OF NEUROACTIVE SUBSTANCES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. EN PRENSA.

BELESLIN, D.B. & MYERS, R.D. 1970. PHYSIOL. BEHAV. 5: 1173-1175.

BERGMEYER, H.U. 1974. METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS, 2ND ED., VOL. 2: 574-579, ACADEMIC PRESS, NEW YORK.

BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. 1975. J. CELL. BIOL. 67: 852-62.

BON, S., RIEGER, F. & MASSOULIÉ, J. 1973. PROPRIÉTÉS DES FORMES ALLOGÉES DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE EN SOLUTION: RAYON DE STOKES, DENSITÉ ET MASSE. EUR. J. BIOCHEM. 35: 372-79.

BON, S. & MASSOULIÉ, J. 1976A. AN ACTIVE MONOMERIC FORM OF ELECTROPHORUS ELECTRICUS ACÉTYLCHOLINESTÉRASE. FEBS LETT. 67: 99-103.

BON, S. & MASSOULIÉ, J. 1976B. MOLECULAR FORMS OF ELECTROPHORUS ACÉTYLCHOLINESTÉRASE THE CATALYTIC SUBUNITS: FRAGMENTATION, INTRA AND INTERSUBUNIT DISULFIDE BONDS. FEBS LETT. 71: 273-78.

- BON, S. & MASSOULIÉ, J. 1978. COLLAGENASE SENSITIVITY AND AGGREGATION PROPERTIES OF ELECTROPHORUS ACETYLCHOLINESTERASE. EUR. J. BIOCHEM. 89: 89-94.
- BRADSHAW, R.A. & SCHNEIDER, D.M., Eds. 1980. PROTEINS OF THE NERVOUS SYSTEM. RAVEN PRESS. NEW YORK.
- BRIHMAN, M.W. KLATZO, I., OLSSON, Y. & REESE, T.S. 1970. THE BLOOD BRAIN BARRIER TO PROTEINS UNDER NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS. J. NEUROL. SCI. 10: 215-239.
- BRONSTED, H.E. 1970A. TRANSPORT OF GLUCOSE, SODIUM, CHLORIDE AND POTASSIUM BETWEEN THE CEREBRAL VENTRICLES AND SURROUNDING TISSUES IN CATS. ACTA PHYSIOL. SCAND. 79: 523-532.
- BRONSTED, H.E. 1970B. EXCHANGE OF GLUCOSE BETWEEN PLASMA, BRAIN EXTRACELLULAR FLUID AND CEREBRAL VENTRICLES IN CATS AN EFFECTS OF INTRAVENTRICULAR ACETAZOLAMIDE AN INSULIN. ACTA PHYSIOL. SCAND. 80: 122-130.
- BROWNSTEIN, M.J., RUSSELL, J.T. & GAINER, H. 1980. SYNTHESIS TRANSPORT AND RELEASE OF POSTERIOR PITUITARY HORMONES. SCIENCE 207: 373-378.
- BRZIN, M., SKETELJ, J., GRUBIC, Z., KIAUTA, T. 1980. CHOLINESTERASES NEUROMUSCULAR JUNCTION NEUROCHEM INTL. 2: 149-159.
- CARTAUD, J., RIEGER, F., BON, S. & MASSOULIÉ, J. 1975. FINE STRUCTURE OF ELECTRIC EEL ACETYLCHOLINESTERASE. BRAIN RES. 88: 127-130.
- CARTER, J.L. & BRIMIJOIN, S. 1980. EFFECTS OF ACUTE AND CHRONIC DENERVATION ON RELEASE OF ACETYLCHOLINESTERASE AND ITS MOLECULAR FORMS IN RAT DIAPHRAGMS. J. NEUROCHEM. 36: 1018-25.

- CHASE, T.N. & KOPIN, I.J. 1968. STIMULUS INDUCED RELEASE OF SUBSTANCES FROM OLFACTORY BULB USING THE PUSH-PULL CANNULA. NATURE 217: 4466-467.
- CHIAPPINELLI, V., GIACOBINI, E., PILAR, G. & UCHIMURA, H. 1976. INDUCTION OF CHOLINERGIC ENZYMES IN CHICK CILIARY GANGLION AND IRIS MUSCLE CELLS DURING SYNAPSE FORMATION. J. PHYSIOL. 257: 749-766.
- CHUBB, I.W. & SMITH, A.D. 1974. RELEASE OF AN ISOENZYME OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM PERFUSED ADRENAL GLAND. J. PHYSIOL (LOND.) 239: 97P-98P.
- CHUBB, I.W., SMITH, A.D. 1975A. ISOENZYMES OF SOLUBLE AND MEMBRANE-BOUND ACETYLCHOLINESTERASE IN BOVINE SPLACHNIC NERVE AND ADRENAL MEDULA. PROC. R. SOC. LOND. (BIOL.) 191: 245-261.
- CHUBB, I.W. & SMITH, A.D. 1975B. RELEASE OF ACETYLCHOLINESTERASE INTO THE PERFUSATE FROM THE OX ADRENAL GLAND. PROC. R. SOC. LOND. B. 191: 263-269.
- CHUBB, I.W., GOODMAN, S., SMITH, A.D. 1976. IS ACETYLCHOLINESTERASE SECRETED FROM CENTRAL NEURONS INTO THE CEREBROSPINAL FLUID? NEUROSCIENCE 1: 57-62.
- CSERR, H.F. 1971. PHYSIOLOGY OF THE CHOROID PLEXUS. PHYSIOL REV. 51 (2): 273-311.
- CUBEDDU, L.X., BARNES, E.M., LANGER, S.Z. & WEINER, N. 1974. RELEASE OF NOREPINEPHRINE AND DOPAMINE β -HYDROXYLASE BY NERVE STIMULATION. I. ROLE OF NEURONAL AND EXTRANEURONAL UPTAKE AND OF ALPHA PRESYNAPTIC RECEPTORS. J. PHARMACOL. EXP. THER. 190: 431-450.

- CURL, F.D. & POLLAY, M. 1968. TRANSPORT OF WATER AND ELECTROLYTES BETWEEN BRAIN AND VENTRICULAR FLUID IN THE RABBIT. EXP. NEUROLOGY 20(4): 558-574.
- DALE, H.H. 1914. THE ACTION OF CERTAIN ESTERS OF CHOLINE AND THEIR RELATION TO MUSCARINE. J. PHARMACOL. EXP. THERAP. 6: 147-90.
- DAVSON, H. 1963. THE CEREBROSPINAL FLUID. ERGEBN. PHYSIOL 52: 20-73.
- DAVSON, H. & POLLAY, M. 1963. INFLUENCE OF VARIOUS DRUGS ON THE TRANSPORT OF ¹³¹I AND PAH ACROSS THE CEREBROSPINAL FLUID BLOOD BARRIER. J. PHYSIOL. 167: 239-246.
- DAVSON, H. & WELCH, K. 1971. THE PERMEATION OF SEVERAL MATERIALS INTO THE FLUIDS OF THE RABBIT'S BRAIN. J. PHYSIOL. 218: 337-351.
- DELGADO, J.M.R. & RUBINSTEIN L. 1964. ARCHS. INT. PHARMACODYN. THER. 150: 530-546.
- DELGADO, J.M.R. 1966. ARCHS. INT. PHARMACODYN, THER. 161: 442-462.
- DE POTTER, W.P., DE SHAEDRYVER, A.F., MOERMAN, E.J. & SMITH, A.D. 1969. J. PHYSIOL. 204: 102-104P.
- DOCHERTY, K. & STEINER, D.F. 1982. POST-TRANSLATIONAL PROTEOLYSIS IN POLYPEPTIDE HORMONE BIOSYNTHESIS. ANN. REV. PHYSIOL. 44: 625-38.
- DOGGET, N.S. & SPENCER, P.S.J. 1972. OUABAIN AND THE ONSET OF THE BLOOD BRAIN BARRIER IN NEONATE CHICKS. NATURE 237: 513-514.
- DORNER, A.J. & KEMPER, B. 1978. BIOCHEMISTRY 17: 5550-55.

- DOUGLAS, W.W. 1968. BR. J. PHARMAC. CHEMOTHER. 34: 451-474.
- DREIFUS, J.J. 1975. ANN. N.Y.REV. SCI. 248: 184.
- R.R. DRUCKER-COLIN, C.W. SPANIS, C.W. COTMAN AND J.L. MCGAUGH. 1975. CHANGES IN PROTEIN LEVELS IN PERFUSATE OF FREELY MOVING CATS: RELATION TO BEHAVIORAL STATE. SCIENCE 187: 963-965.
- DRUCKER-COLIN, R. & SPANIS, C.W. 1975. NEUROHUMORAL CORRELATES OF SLEEP: INCREASE OF PROTEINS DURING RAPID EYE MOVEMENT SLEEP. SEPARATUM EXPERIENTIA 31: 551-552.
- DRUCKER-COLIN, R. 1981. ENDOGENOUS SLEEP PEPTIDES, IN: D. WHEATLEY (ED.), PSYCHOPHARMACOLOGY OF SLEEP, RAVEN PRESS, N.Y., 1981 PP. 53-72.
- DUDAI, Y., HERZBERG, M., SILMAN, I. 1973. MOLECULAR STRUCTURES OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM ELECTRIC ORGAN TISSUE OF THE ELECTRIC EEL. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 70: 2473-76.
- DUDAI, Y., SILMAN. 1974 THE MOLECULAR WEIGHT AND SUBUNIT STRUCTURE OF ACETYLCHOLINESTERASE PREPARATIONS FROM THE ELECTRIC ORGAN OF THE ELECTRIC EEL. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 59: 117-24.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. & FEATHERSTONE R.M. 1961. A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. BIOCHEM. PHARMACOL. 7: 88-95.
- FELDBERG, W. & SHERWOOD, S.L. 1954. J. PHYSIOL. 123: 138-167.
- FERNÁNDEZ, H.L. & INESTROSA, N.C. 1976. NATURE 262: 55-56

FLEISCHHAUER, K. 1961. REGIONAL DIFFERENCES IN THE STRUCTURE OF THE EPENDYMA AND SUBEPENDYMAL LAYERS OF THE CEREBRAL VENTRICLES OF THE CAT. IN: REGIONAL NEUROCHEMISTRY (S. KEITY AND J. ELKES, EDS.), PP. 279-283, PERGAMON PRESS, LONDON.

FÖLDI-BÖRCSÖK, E. & FÖLDI, M. 1973. PERMEABILITY OF THE BLOOD BRAIN BARRIER IN LYMPHOSTATIC ENCEPHALOPATHY COMBINED WITH COMPLEX VITAMIN B DEFICIENCY: THE PROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN (FACTOR) P TREATMENT. EXPERIENTIA 29: 985-987.

FOX, R.H. & HILTON, S.M. 1958. J. PHYSIOL. 142: 219.

FRIZELL, M., HASSELGREN, P.O. & SJOSTRAND, J. 1970. AXOPLASMIC TRANSPORT OF ACETYLCHOLINESTERASE AND CHOLINE-ACETYLTRANSFERASE IN THE VAGUS AND HYPOGLOSSAL NERVE OF THE RABBIT EXP. BRAIN RES. 10: 526-531.

FRONTALI, N. & GAINER, H., IN PEPTIDES IN NEUROBIOLOGY H. GAINER. ED. (PLENUM, NEW YORK, 1977), PP. 259-294.

FUENMAYOR, L., SMITH, A.D. & VOGT, M. 1976. ACETYLCHOLINESTERASES IN PERFUSATES OF CAT'S CEREBRAL VENTRICLES. PHYSIOL SOC. 165P-166P.

GADDUM, J.H. 1960. PUSH-PULL CANNULAE. J. PHYSIOL. LONDON 155: 1-2.

GADDUM, J.H. 1961. J. PHYSIOL. 155: 1-2P.

GADDUM, J.H. 1962. SUBSTANCES RELEASED IN NERVOUS ACTIVITY. IN: PHARMACOL. ANALYSIS OF CENTRAL NERVOUS ACTION, ED. BY W.D.M. PATON & P. LINDGREN. OXFORD: PERGAMON, 1962, PP. 1-6.

GADEA-CIRIA, M., STADLER, H., LLOYD, K.G. & BARTHOLINI, G. ACETYLCHOLINE RELEASE WITHIN THE CAT STRIATUM DURING THE SLEEP-WAKEFULNESS CYCLE. NATURE 243: 518-519 (1973).

GEFFEN, L.B., LIVETT, B.G. & RUSH R.A. 1970. IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF CHROMOGRANINS IN SHEEP SYMPATHETIC NEURONS AND THEIR RELEASE BY NERVE IMPULSES. IN: NEW ASPECTS OF STORAGE AND RELEASE MECHANISMS OF CATECHOLAMINES, ED. BY H.G. KRONEBERG AND H.J. SCHUMAN N.Y.: SPRINGER VERLAG, 1970 PP. 58-72.

GEWIRTZ, G.P. & KOPIN, I.J. 1970. RELEASE OF DOPAMINE HYDROXYLASE WITH NOREPINEPHRINE DURING CAT SPLENIC NERVE STIMULATION. NATURE 227: 406-407.

GIACOBINI, E. 1959. THE DISTRIBUTION AND LOCALIZATION OF CHOLINESTERASES IN NERVE CELLS. ACTA PHYSIOL. SCAND. 45 (SUPPL. 156): 1-45.

GISIGER, V. & VIGNY, M. 1977. A SPECIFIC FORM OF ACETYLCHOLINESTERASE IS SECRETED BY RAT SYMPATHETIC GLANGLIA FEBS LETT. 84: 253-56.

GREENFIELD, S.A. & SMITH, A.D. 1976. CHANGES IN ACETYLCHOLINESTERASE CONCENTRATION RABBIT CEREBROSPINAL FLUID FOLLOWING CENTRAL ELECTRICAL STIMULATION. J. PHYSIOL. (LOND.) 258: 108P.

GREENFIELD., S.A. & SMITH, A.D. 1979. THE INFLUENCE OF ELECTRICAL STIMULATION OF CERTAIN BRAIN REGIONS ON THE CONCENTRATION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN RABBIT CEREBROSPINAL FLUID. BRAIN RES. 177: 445-459.

GREENFIELD, S.A., CHUBB, I.W. & SMITH, A.D. 1979. THE EFFECT OF CHLORPROMAZINE ON THE CONCENTRATION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF RABBITS. NEUROPHARMACOL. 18: 127-132.

GREENFIELD, S.A., CHERAMY, A., LEVIEL, V & GLOWINSKI J. 1980
IN VIVO RELEASE OF ACETYLCHOLINESTERASE IN CAT SUBSTANTIA NIGRA AND CAUDATE NUCLEUS. NATURE 284: 355-357.

GREENFIELD, S., CHERAMY, A. & GLOWINSKI, J. 1983. EVOKED RELEASE OF PROTEINS FROM CENTRAL NEURONS IN VIVO. J. NEUROCHEM. 40: 1048-1057.

GREENFIELD, S.A. & SHAW, S.G. 1984. IS THE EVOKED RELEASE OF ENZYMES FROM NEURONS IN THE BRAIN A FORM OF NEUROMODULATION? IN PRESS (COMUNICACIÓN PERSONAL).

GUTH, L., ALBERS, R.W. & BROWN, W.C. 1964. EXPL. NEUROL. 10: 236-250.

HINES, J.F. & GARWOOD, M.M. 1977. RELEASE OF PROTEIN FROM AXONS DURING RAPID AXONAL TRANSPORT: AN IN VITRO PREPARATION BRAIN RES. 125: 141-148.

HOLLUNGER, E.G., NIKLASSON, B.H. 1973. THE RELEASE AND MOLECULAR STATE OF MAMMALIAN BRAIN ACETYLCHOLINESTERASE. J. NEUROCHEM. 20: 821-26.

HONCHAR, M.P., HARTMAN, B.K. & SHARPE, L.G. 1979. EVALUATION OF IN VIVO BRAIN SITE PERFUSION WITH THE PUSH-PULL CANNULA. AM. J. PHYSIOL. 236: R 45-56.

INESTROSA, N.C., RAMÍREZ, B.U. & FERNÁNDEZ, H.L. 1977. J. NEUROCHEM. 28: 941-945.

INOUE, M., DIRIENZO, J., MAEDA, T., MOVVA, R., NAKAMURA, K., LEE, N., PIRTLE, R. & PIRTLE, I. 1980. ANN. N.Y. ACAD. SCI. 343: 362-67.

JACKSON, R.C. & BLOBEL, G. 1977. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 74: 5598-602.

JACKSON, R.C. & BLOBEL, G. 1980. ANN. N.Y. ACAD. SCI. 343: 391-402.

JOHNSON S. & DOMINO, E.F. 1971. CHOLINERGIC ENZYMATIC ACTIVITY OF CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH VARIOUS NEUROLOGIC DISORDERS. CLIN. CHEM. ACTA. 35: 421-428.

JOHNSON, C.D., SMITH, S.P. & RUSSELL, R.L. 1977. ELECTROPHORUS ELECTRICUS ACETYLCHOLINESTERASE: SEPARATION AND SELECTIVE MODIFICATION BY COLLAGENASE. J. NEUROCHEM. 28: 617-24.

KALSBECK, F., COHEN, J.A. & BOVENS, B.R. 1950. CHOLINESTERASE IN CEREBROSPINAL FLUID. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. (AMST.) 5: 548-560.

KASCHNITZ, T. & KREIL, G. 1978. BIOCHEM BIOPHYS. RES. COMMUN. 83: 901-907.

KIAUTA, T., BRZIN, M. & DETTBARN, W.D. 1977. EXPL. NEUROL. 56: 281-288.

KIMHI, Y., MAHLER, A. & SAYA, D. 1980. ACETYLCHOLINESTERASE IN MOUSE NEUROBLASTOMA CELLS: INTRACELLULAR AND RELEASED ENZYME. J. NEUROCHEM. 34: 554-59.

KLATZO, I., MIQUEL, J., FERRIS, P.J., PROKOP, J.D. & SMITH, D.E. 1964. OBSERVATIONS ON THE PASSAGE OF THE FLUORESCENCE IN LABELED SERUM PROTEINS (FLSP) FROM THE CEREBROSPINAL FLUID. J. NEUROPATHOL. EXP. NEUROL. 23: 18-35.

KOELLE, G.B., ED. 1963. CHOLINESTERASES AND ANTICHOLINESTERASE AGENTS. BERLIN: SPRINGER.

KORR, I.M. & APPELTAUER, G.S.L. 1971. FEDN. PROC. 30: 665

KORR, I.M. & APPELTAUER, G.S.L. 1977. EXPL. NEUROL. 57: 713-724.

- KREUTZBERG, G.W. & TOH, L. 1974. DENDRITIC SECRETION: A WAY FOR THE NEURON TO COMMUNICATE WITH THE VASCULATURE. NATURE 271: 37.
- KREUTZBERG, G.W., TOH, L. & KAIYA, H. 1975. ACETYLCHOLINESTERASE AS A MARKER FOR DENDRITIC TRANSPORT AND DENDRITIC SECRETION. ADV. NEUROL. 12: 269-81.
- KREUTZBERG, G.W., KAIYA, H. & TOH, L. 1979. DISTRIBUTION AND ORIGIN OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE CAPILLARIES OF THE BRAIN. HISTOCHEM. 61: 111-22.
- LAZAR, M. & VIGNY, M. 1980. MODULATION OF THE DISTRIBUTION OF ACETYLCHOLINESTERASE MOLECULAR FORMS IN A MURINE NEUROBLASTOMA X SYMPATHETIC GANGLION CELL HYBRID CELL LINE. J. NEUROCHEM. 35: 1067-79.
- LEE, J.C. & OLZEWSKI, J. 1960. PENETRATION OF RADIOACTIVE BOVINE ALBUMIN FROM CEREBROSPINAL FLUID INTO BRAIN TISSUE. NEUROLOGY 10: 814-822.
- LEHMANN, J. & FIBIGER, H.C. 1978. J. NEUROCHEM. 30: 615-624.
- LEHMANN, J., FIBIGER, H.C. & BUCHER, L.L. 1979. NEUROSCIENCE 4: 217-225.
- LEUSEN, I. 1950. THE INFLUENCE OF CALCIUM, POTASSIUM AND MAGNESIUM IONS IN CEREBROSPINAL FLUID ON VASOMOTOR SYSTEM. J. PHYSIOL. LONDON 110: 319-329.
- LEVIN, E. & SCICLI, G. 1969. BRAIN BARRIER PHENOMENA. BRAIN RES. 13: 1-12.
- LEVIN, E. & SISSON, W.B. 1972. THE PENETRATION OF RADIOLABELLED SUBSTANCES INTO RABBIT BRAIN FROM SUBARACHNOID SPACE. BRAIN RES. 41: 145-153.

- LIVINGSTON, R.B. 1960. CEREBROSPINAL FLUID. IN: MEDICAL PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS. 18TH E. (T.C. RUCH AND J.F. FULTON, EDs.), PP. 889-902, SAUNDERS, PHILADELPHIA AND LONDON.
- LOEWI, O., NAVRATIL, E. 1926. UBERTRAGBARKE IT DER HERZNERVENWIRKUNG XI UBER DEN MECHANISMUS DER VAGUSWIRKUNG VON PHY-SOSTIGMIN UND ERGOTAMIN PFLUGERS ARCH. 214: 689-96.
- LOH, Y.P. & GRITSCH, H.A. 1981. EUROP. J. CELL. BIOL. 26: 177-183.
- LOH, Y.P. & CHANG, T-L, 1982. CHARACTERIZTION OF ENZYMES IN VOLVED IN THE INTRAGRANULAR PROCESSING OF NEUROPEPTIDES. Soc. F. Nsci. SHORT COURSE 93-103.
- LOH, Y.P. & CHANG, T-L, 1982. PRO-OPIOCORTIN CONVERTING AC-TIVITY IN RAT INTERMEDIATE AND NEURAL LOBE SECRETORY GRANU--LES. FEBS LETT. 137: No. 1, PP. 57-62.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. PROTEIN MEASUREMENTE WITH THE FOLIN-PHENOL REAGENT. J. BIOL. CHEM. 193: 265-275.
- LUBINSKA, L., NIEMERKO, S. 1971. VELOCITY AND INTENSITY OF BIDIRECTIONAL MIGRATION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN TRANSECTED NERVES. BRAIN RES. 27: 329-42.
- MARCHAND, A., CHAPOUTHIER, G. & MASSOULIÉ, J. 1977. DEVELOPMENTAL ASPECT OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN CHICK BRAIN FEBS LETT. 78: 233-36.
- MARKS, N. & LAJTHA, A. 1963. BIOCHEM J. 89: 438-447.
- MARKS, N. & LAJTHA, A. 1965. BIOCHEM J. 97: 74-83.

MARKS, N., DATTA, R.K. & LAJTHA, A. 1968 J. BIOL. CHEM. 243: 2882-2889.

MARKS, N., DATTA, R.K. & LAJTHA, A. 1968. IN "MACROMOLECULES AND THE FUNCTION OF THE NEURON". (Z. LODIN AND S.P.R. ROSE, EDS.), PP. 220-231. EXCERPTA MED. FOUND., AMSTERDAM.

MARKS, N. & LAJTHA, A. 1970. IN "PROTEIN METABOLISM OF THE NERVOUS SYSTEM" (LAJTHA, A., ED.), PP. 39 PLENUM, N.Y.

MASSOULIÉ, J., RIEGER, F. 1969. L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE DES ORGANES ÉLECTRIQUES DE POISSONS (TORPILLE ET GYMNOTE). EUR. J. BIOCHEM. 11: 441-55.

MASSOULIÉ, J., RIEGER, F. & BON, S. 1970A. RELATIONS ENTRE LES COMPLEXES MOLÉCULAIRES DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE. COMPT. REND. ACAD. SCI. PARIS 270: 1837-40.

MASSOULIÉ, J., RIEGER, F. & TSUJI, S. 1970B. SOLUBILIZATION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE DES ORGANES ÉLECTRIQUES DE GYMNOTE ACTION DE LA TRYPSINE. EUR. J. BIOCHEM. 14: 430-39.

MASSOULIÉ, J., RIEGER, F., BON, S. 1971. ESPECES ACÉTYLCHOLINESTÉRASIQUES GLOBULAIRES ET ALLONGÉES DES ORGANES ÉLECTRIQUES DE POISSONS. EUR. J. BIOCHEM. 21: 542-51.

MASSOULIÉ, J., BON, S., VIGNY, M. 1980. THE POLYMORPHISM OF CHOLINESTERASE IN VERTEBRATES NEUROCHEM. INT. 2: 161-84.

MASSOULIÉ, J. & BON, S. 1982. THE MOLECULAR FORMS OF CHOLINESTERASE AND ACETYLCHOLINESTERASE IN VERTEBRATES. ANN. REV. NEUROSCI. 5: 57-106.

MCLENNAN, H. 1964. THE RELEASE OF ACETYLCHOLINE AND 3-HYDROXYTRYPTAMINE FROM THE CAUDATE NUCLEUS. J. PHYSIOL., LONDON 174: 152-161.

- MENDEL, B., MUNDELL, D.B. & RUDNEY, H. 1943A. STUDIES ON CHOLINESTERASE. A SPECIFIC TEST FOR TRUE CHOLINESTERASE AND PSEUDOCHOLINESTERASE. BIOCHEM. J. 37: 473-76.
- MENDEL, B. & RUDNEY, H. 1943B. STUDIES ON CHOLINESTERASE. CHOLINESTERASE AND PSEUDO-CHOLINESTERASE. BIOCHEM. J. 37: 59-63.
- MITCHELL, F.J. & SZERB, J.C. 1962. THE SPONTANEOUS AND EVOKED RELEASE OF ACETYLCHOLINE FROM THE CAUDATE NUCLEUS. IN--TERN. CONGR. PHYSIOL. SCI., 22ND. LEIDEN, PP. 814.
- MONNIER, M. & SCHOENENBERGER, G.A. 1974. NEUROHUMORAL CODING OF SLEEP BY THE PHYSIOLOGICAL SLEEP FACTOR DELTA. IN: NEUROHUMORAL CODING OF BRAIN FUNCTION ED. BY R.D. MYERS AND R.R. DRUCKER-COLIN. N.Y. PLENUM PRESS. PP. 207-232.
- MUSICK, J.R. 1977. RELEASE OF LOW MOLECULAR WEIGHT AMINO--COMPOUNDS BY NERVE STIMULATION OF PARALYZED NEUROMUSCULAR --PREPARATIONS. ABSTR. SOC. NEUROSCI. 3: 374.
- MUSICK, J.R. 1979. CORRELATED RELEASE OF ACETYLCHOLINE AND PROTEIN FROM THE NEUROMUSCULAR JUNCTION. AM. PHYSIOL. SOC. C225-C232.
- MYERS, R.D. 1970. PHYSIOL. BEHAV. 5: 243-246.
- MYERS, R.D. & BELESLIN, D.B. 1970. THE SPONTANEOUS RELEASE OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE AND ACETYLCHOLINE WITHIN THE DIENCE--PHALON OF UNANESTHETIZED RHESUS MONKEY. EXPTL. BRAIN RES. 11: 549-552.
- MYERS, R.D., YAKSH, T.L., G.H. & VEALE, W.L. 1971B J. APPL. PHYSIOL. 30: 589-592.

MYERS, R.D. 1972. METHODS FOR PERFUSING DIFFERENT STRUCTURES OF THE BRAIN. IN: METHODS IN PSYCHOBIOLOGY, ED. BY R.D. MYERS. N.Y. ACADEMIC, VOL. 2, PP. 169-211.

MYERS, R.D. & CHINN C. 1973. EVOKED RELEASE OF HYPOTHALAMIC NOREPINEPHRINE DURING THERMOREGULATION IN THE CAT. AM. J. PHYSIOL 224: 230-236.

MYERS, R.D. "HANDBOOK OF DRUG AND CHEMICAL STIMULATION OF THE BRAIN BEHAVIORAL PHARMACOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS" 759 PP. VAN NOSTRANA-REINHOLD. NEW YORK.

NACHMANSOHN, D. & ROTHENBERG, M.A. 1945. STUDIES ON CHOLINESTERASE I ON THE SPECIFICITY OF THE ENZYME IN NERVE TISSUE J. BIOL. CHEM. 158: 653-66.

NAGY, J., VINCENT, S.R., LAHMANN, J., MCGEER, E.G. & FIBIGER H.C. 1977. SOC. NEUROSCI. ABSTR. 3: 43.

NIEOULLON A., CHERAMY A., & GLOWINSKI J. 1977A. AN ADAPTATION OF THE PUSH-PULL CANNULA METHOD TO STUDY THE IN VIVO RELEASE OF ³H-DOPAMINE SYNTHESISED FROM ³H-TYROSINE IN CAT CAUDATE NUCLEUS: EFFECTS OF VARIOUS PHYSICAL AND PHARMACOLOGICAL TREATMENTS. J. NEUROCHEM. 28: 819-828.

OH, T.H., MARKELONIS, G.J. 1978. NEUROTROPHIC PROTEIN REGULATES MUSCLE ACETYLCHOLINESTERASE IN CULTURE. SCIENCE 200: 337-38.

OLDENDORF, W.H., 1973A. CARRIER-MEDIATED BLOOD BRAIN BARRIER TRANSPORT OF SHORT CHAIN MONOCARBOXYLIC ORGANIC ACIDS. AM J. PHYSIOL. 224: 1450-1453.

OLDENDORF, W.H., 1973B. STEREOSPECIFICITY OF BLOOD BRAIN BARRIER PERMEABILITY TO AMINOACIDS. AM. J. PHYSIOL. 224: 967-969.

PALLADIN, A.V. & BELIK, YA. V. 1970. IN "PROTEIN METABOLISM OF THE NERVOUS SYSTEM" (A. LAITHA. ED.), PP. 77 PLENUM, N.Y.

PAPPENHEIMER, J.R., HEISEY, S.R., JORDAN, E.F. & DOWNER J. DE C. 1962. PERFUSION OF THE CEREBRAL VENTRICULAR SYSTEMS IN UNANESTHETIZED GOATS. AM J. PHYSIOL. 203: 763-774.

PARDRIGE, W.M., CRAWFORD, I.L. & CONNOR, J.D. 1973. PERMEABILITY CHANGES IN THE BLOOD BRAIN BARRIER INDUCED BY NORTRYPTILINE AND CHLORPROMAZINE. TOXICOL. APPL. PHARMACOL. 26: 49-57.

PATZELT, G., LABRECQUE, A.D., DUGUID, J.R., CARROLL, R.J., KEIM, P., HEINRIKSON, R.L. & STEINER, D.F. 1978. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 75: 1260-64.

PAVANS, M. 1974. CECCATTY, PERSPECT. BIOL. MED. 17:379.

PHILIPPU, A., PRZUNTEK, H. & ROENSBURG, W. 1973. SUPERFUSION OF THE HYPOTHALAMUS WITH GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID: EFFECT ON THE RELEASE OF NORADRENALINE AND BLOOD PRESURE. NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCH. PHARMACOL. 276: 103-118.

PLATTNER, F. & HINTNER, H. 1930. DIE SPALTUNG VON ACETYLCHOLIN DURCH ORGANEXTRAKTE UND KORPERFLUGSSIGKEITEN. PFLUG. ARCH. GES. PHYSIOL. 225: 19-25.

PLUM, C.M. & FOG, T. 1960. THE CHOLINESTERASE ACTIVITY OF CEREBROSPINAL FLUID. ACTA PSYCHIATR. NEUROL. SCAND. (SUPPL.) 148: 28-40.

POBERAI, M., SÁVAY, G & CSILLIK, B. 1972. FUNCTION-DEPENDENT PROTEINASE ACTIVITY IN THE NEUROMUSCULAR SYNAPSE. NEUROBIOLOGY. 2: 1-7.

RAPOPORT, S.I. HORI, M. & KLATZO. I. 1971. REVERSIBLE OSMOTIC OPENING OF THE BLOOD BRAIN BARRIER. SCIENCE 173: 1026-1028.

- RAPOPORT, S.I., HORI, M. & KLATZO, I. 1972. TESTING OF A HYPOTHESIS FOR OSMOTIC OPENING OF THE BLOOD BRAIN BARRIER. AM. J. PHYSIOL. 223: 323-331.
- RIEGER, F. & VIGNY, M. 1976. SOLUBILIZATION AND PHYSIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF RAT BRAIN ACETYLCHOLINESTERASE: DEVELOPMENT AND MATURATION OF ITS MOLECULAR FORMS. J. NEUROCHEM 27: 121-29.
- RINDERKNECHT, H., GEOKAS, M.C., SILVERMAN, P. & HAVERBACK B.J. 1968. A NEW ULTRASENSITIVE METHOD FOR THE DETERMINATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY. CLIN. CHEM. ACTA 21: 197-203.
- ROSENBERRY, T.L. 1975. ACETYLCHOLINESTERASE. ADV. ENZYMOL. 43: 103-218.
- ROSENBERRY, T.L. & RICHARDSON, J.M. 1977. STRUCTURE OF 18 S AND 14 S ACETYLCHOLINESTERASE. IDENTIFICATION OF COLLAGEN-LIKE SUBUNITS THAT ARE LINKER BY DISULFIDE BONDS TO CATALYTIC SUBUNITS. BIOCHEM 16: 550-58.
- ROTUNDO, R.L. & FAMBROUGH, D.M. 1980A. SYNTHESIS, TRANSPORT AND FATE OF ACETYLCHOLINESTERASE IN CULTURED CHICK EMBRYO - MUSCLE CELLS. CELL 22: 583-94.
- ROTUNDO, R.L. & FAMBROUGH, D.M. 1980B. SECRETION OF ACETYLCHOLINESTERASE: RELATION TO ACETYLCHOLINE RECEPTOR METABOLISMS. CELL 22: 595-602.
- SCHARRER, E.Z. 1928. VGL. PHYSIOL. 3: 1.
- SCHARRER, B., IN FORTY-SEVENTH JAMES ARTHUR LECTURE ON THE EVOLUTION OF THE HUMAN BRAIN (AMERICAN MUSEUM OF NATURAL HISTORY, N.Y., 1977) PP. 1-17.

- SCHMITT, F.O. 1968 II. THE MOLECULAR BIOLOGY OF NEURONAL FIBROUS PROTEINS. NEUROSCI. RES. PROGR. BULL. 6: 119-144.
- SHIELDS, B. & BLOBEL, G. 1978. J. BIOL. CHEM. 253: 3753-56.
- SIDNEY, P., COLOWICK & NATHAN O. KAPLAN, EDs. 1955. METHODS IN ENZYMOLOGY. VOL. I PP. 441. ACADEMIC PRESS INC.
- SKANGIEL-KRAMSKA, J. & NIEMERKO, S. 1971. ISOENZYMES OF ACETYLCHOLINESTERASE IN THE SCIATIC NERVE OF RABBIT AND THEIR MOLECULAR WEIGHT. BULL. ACAD. POL. SCI. 19: 389-393.
- SKAU, K.A. & BRIMIJOIN, S. 1978. RELEASE OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM RAT HEMIDIAPHRAGM PREPARATIONS STIMULATED THROUGH THE PHRENIC NERVE. NATURE 275: 224-226.
- SMILOWITZ, H. 1980. MONOVALENT IONOPHORES INHIBIT ACETYLCHOLINESTERASE RELEASE FROM CULTURED CHICK EMBRYOSKELETAL MUSCLE CELLS. MOL. PHARMACOL. 16: 202-14.
- SMITH, A.D. 1968. IN THE INTERACTION OF DRUGS AND SUBCELLULAR COMPONENTS IN ANIMAL CELLS, ED. BY CAMPBELL, P.N., PP. 239-292. LONDON: J. AND A. CHURCHILL, LTD.
- SMITH, A.D., DE POTTER, W.P. MOERMAN, E.J. & DE SCHAEPRDYVER 1970. RELEASE OF DOPAMINE-HYDROXYLASE AND CHROMOGRANIN AN UPON STIMULATION OF THE SPLENIC NERVE. TISSUE CELL. 2: 547-567.
- SOMOGY, P., CHUBB, I.W. & SMITH, A.D. 1975. A POSSIBLE STRUCTURAL BASIS FOR THE RELEASE OF ACETYLCHOLINESTERASE. PROC. R. SOC. LOND. B. 191: 271-283.

STADLER, H. LLOYD, K.G., GADEA-CIRIA, M. & BARTHOLINI, G. 1973. ENHANCED STRIATAL ACETYLCHOLINE RELEASE BY CHLORPROMAZINE AND ITS REVERSAL BY APOMORPHINE. BRAIN. RES. 55: 476-480.

STEDMAN, EDGAR, STEDMAN ELLEN, EASSON, L.H. 1932. CHOLINE-ESTERASE. AN ENZYME PRESENT IN THE BLOOD SERUM OF THE HORSE BIOCHEM. J. 26: 2056-66.

STEDMAN, EDGAR, STEDMAN, ELLEN. 1935. THE RELATIVE CHOLINE ESTERASE ACTIVITIES OF SERUM AND CORPUSCLES FROM THE BLOOD OF CERTAIN SPECIES. BIOCHEM. J. 29: 2107-11.

STEIN, L. & WISE, G.O. 1969. RELEASE OF NOREPINEPHRINE FROM HYPOTHALAMUS AND AMYGDALA BY REWARDING STIMULATION OF THE MEDIAL FOREBRAIN BLUNDLE. J. COMP. PHYSIOL. PSYCHOL. 67: 189-198.

SULSER, F., OWENS, M.L., STRADA, S.J. & DINGELL, J.V. 1969. MODIFICATION BY DESIPRAMINE (DMI) OF THE AVAILABILITY OF NOREPINEPHRINE RELEASED BY RESERPINE IN THE HYPOTHALAMUS OF THE RAT IN VIVO. J. PHARMACOL. EXPTL. THERAP. 168: 272-282.

SVENSMARK, O. 1961. CHOLINESTERASES IN HUMAN SPINAL FLUID AND BRAIN. ACTA PHYSIOL. SCAND. 52: 372-378.

T.P. KING, A.C. ALAGÓN, J. KUAN, A.K. SOBOTKA & L.M. LICHTENSTEIN. 1983. IMMUNOCHEMICAL STUDIES OF YELLOW JACKET VENOM PROTEINS. MOL. IMMUNOL. 20, No. 3 pp. 297-308.

THORN, N.A., RUSSEL, J.T., TORP-PEDERSEN, C. & TREIMAN M. 1978. ANN. N.Y. ACAD. SCI. 307: 618.

TRABUCCHI, M., CHENEY, D.L., RACAGNI, G. & COSTA, E. 1974. INVOLVEMENT OF BRAIN CHOLINERGIC MECHANISMS IN THE ACTION OF CHLORPROMAZINE. NATURE (LOND) 249: 664-666.

UZMAN, L.L., RUMLEY, M.K. & VAN DEN ROOT, S. 1961. J. NEUROCHEM. 6: 299.

VIGNY, M., BON, MASSOULIÉ, J., LETERRIER, F. 1978A. ACTIVE SITE CATALYTIC EFFICIENCY OF ACETYLCHOLINESTERASE MOLECULAR FORMS IN ELECTROPHORUS, TORPEDO, RAT AND CHICKEN. EUR. J. BIOCHEM. 85: 317-23.

VIGNY, M., GISIGER, V., MASSOULIÉ, J. 1978B. "NONSPECIFIC" CHOLINESTERASE AND ACETYLCHOLINESTERASE IN RAT TISSUES: MOLECULAR FORMS, STRUCTURAL AND CATALYTIC PROPERTIES, AND SIGNIFICANCE OF THE TWO ENZYME SYSTEMS. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 75: 2588-92.

VOLICER, L. & LOEW, C.G. 1971. PENETRATION OF ANGIOTENSIN II INTO THE BRAIN. NEUROPHARMACOLOGY 10: 631-636.

W.W. DOUGLAS. 1974. HANDB. PHYSIOL. 4: 191.

WAGNER, A., HASSLER, R. & KIM, J.S. 1975. TRNAS. INT. SOC. NEUROCHEM. BARCELONA ABSTR. 59: 116

WALLACE, B.G., & GILLON J.W. 1982. CHARACTERIZATION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN THE LEECH CENTRAL NERVOUS SYSTEM. THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE 2(8): 1108-1118.

WEBB, G. 1978. ACETYLCHOLINESTERASE: CHARACTERIZATION OF NATIVE AND PROTEOLYTICALLY DERIVED FORMS AND IDENTIFICATION OF STRUCTURAL PROTEIN COMPONENTS. CAN. J. BIOCHEM. 56: 1124-32.

WEINSHILBOUM, R.M., THOA, N.B., JOHNSON, D.G., KOPIN, I.J. & AXELROD, J. 1971. PROPORTIONAL RELEASE OF NOREPINEPHRINE AND DOPAMINE HYDROXYLASE FROM SYMPATHETIC NERVES. SCIENCE 174: 1349-1351.

- WEISS, P. 1961. THE CONCEPT OF PERPETUAL NEURONAL GROWTH AND PROXIMODISTAL SUBSTANCE CONVECTION. REGIONAL NEUROCHEMISTRY, ED. KETTY S.S., ELKES
J. PP. 220-242. PERGAMON PRESS, OXFORD.
- WHEELER, D.D., BOYARSKY, L.L. & BROOKS, W.H.J. 1966. CELL. PHYSIOL. 67: 141-148.
- WILSON, B.W., LINKHART, S.G., NIEBERG, P.A. 1973A. ACETYLCHOLINESTERASE IN SINGLE AND MULTIPLY INNERVATED MUSCLES OF NORMAL AND DYSTROPHIC CHICKENS. J. EXP. COL. 186: 187-92.
- WILSON, B.W., NIEBERG, P.S., WALKER, C.R., LINKHART, T.A., FRY, D.M. 1973B. PRODUCTION AND RELEASE OF ACETYLCHOLINESTERASE BY CULTURED CHICK EMBRYO MUSCLE. DEV. BIOL. 33: 285-99.
- WRÓBLEWSKI, F., & LA DUE, J.S. 1955. LACTATE DESHYDROGENASE ACTIVITY IN BLOOD. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 90: 210-213
- YAKSH, T.L. & YAMAMURA, H.I. 1973. STUDY ON THE IN VIVO METABOLISM OF ³H-CHOLINE IN DISCRETE BRAIN REGIONS OF UNANESTHETIZED CAT USING THE PUSH-PULL PERFUSION TECHNIQUE. TRANS AM. SOC. NEUROCHEM. 4: 129.
- YAKSH, T.L., & YAMAMURA, H.I. 1973. THE EFFECTS OF MORPHINE IN VIVO ON RESTING AND EVOKED RELEASE OF ³H-ACETYLCHOLINE FROM THE CAT CAUDATE NUCLEUS. PHARMACOLOGIST. 15:203.
- YAKSH, T.L. & YAMAMURA, H.I. 1974. FACTORS AFFECTING PERFORMANCE OF THE PUSH-PULL CANNULA IN BRAIN. JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY, 37(3): 428-434.

ZIMMERMAN, M., ASHE, B.M., ALBERTS, A.W., PIERZCHALA, P.A.,
POWERS, J.C. NISHINO, N., STRAUSS, W.W. & MUMFORD, R.A. 1980
ANN. N.Y. ACAD. Sci. 343: 405-13.

ZWIZINSKI, C. & WICKNER, W. 1980. J. BIOL. CHEM.
255: 7973-77.